

Bestimmung der Struktur der
15. Domäne des Multidomäneninhibitors LEKTI
mittels NMR-Spektroskopie
und
Design einer inhibitorisch wirksamen Mutante

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät Biologie, Chemie und Geowissenschaften
der Universität Bayreuth

vorgelegt von

Klaus Vitzithum

Bayreuth 2004

Die vorliegende Arbeit wurde von Februar 2001 bis Juni 2004 am Lehrstuhl für Struktur und Chemie der Biopolymere der Universität Bayreuth unter der Leitung von PD Dr. Ute C. Marx angefertigt.

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.).

Promotionsgesuch eingereicht am: 14.07.2004

Tag des wissenschaftlichen Kolloquiums: 17.12.2004

Erster Gutachter: PD Dr. Ute C. Marx

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Jochen Balbach

„Dies diem docet !“

-

„Der eine Tag ist des anderen Lehrmeister !“

(Publilius Syrus)

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG	1
1.1 Bedeutung von Proteinasen und Proteinase-Inhibitoren	1
1.2 Strukturelle Charakteristika kleiner „kanonischer“ Serin- proteinase-Inhibitoren	2
1.3 Wechselwirkung zwischen Proteinase und inhibitorischer Schleife	4
1.4 Der 15-Domänen Serinproteinase-Inhibitor LEKTI	5
2 ZIELE	13
3 MATERIALIEN UND METHODEN	15
3.1 Bakterienstämme	15
3.2 Plasmide	16
3.3 Oligodesoxyribonukleotide	19
3.4 Enzyme, Standards und Chemikalien	19
3.5 Sonstige Materialien und Geräte	20
3.6 Molekularbiologische Arbeitsmethoden	21
3.6.1 Isolierung von Plasmid-DNA	21
3.6.2 Fällung und Reinigung von DNA	21
3.6.3 Modifikation von DNA	22
3.6.4 Anwendungen der Polymerase-Kettenreaktion	22
3.6.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	24
3.6.6 DNA-Sequenzierung	24
3.7 Mikrobiologische und präparative Arbeitsmethoden	24
3.7.1 Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA	24
3.7.2 Anzucht von Bakterien	26
3.7.3 Expression der Fusionsproteine	27
3.7.4 Reinigung der Fusionsproteine	28
3.7.4.1 Zellaufschluss	28
3.7.4.2 Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie	29
3.7.5 Entfernen des Fusionsanhangs	30
3.7.5.1 Spaltung der Fusionsproteine mit Proteinasen	30
3.7.5.2 Trennung von Protein und Fusionsanhang	30
3.7.5.3 Größenausschlusschromatographie	31

3.7.5.4 Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC)	31
3.8 Massenspektrometrie	32
3.9 Aminoterminal Sequenzierung	32
3.10 Konzentrationsbestimmung von Proteinen	32
3.11 Elektrophoretische Verfahren	33
3.11.1 Agarose-Gelelektrophorese	33
3.11.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	34
3.12 Bestimmung der inhibitorischen Aktivität	35
3.12.1 Test auf Reduzierung der HIV-Infektionsrate	35
3.12.2 Test auf Inhibierung von Trypsin	36
3.12.3 Test auf Inhibierung weiterer Proteinasen	37
3.13 Oxidative Rückfaltung von GPdom15ldti	39
3.14 Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie	39
3.14.1 Probenvorbereitung	39
3.14.2 Gerät und Messbedingungen	40
3.14.3 Evaluierung der CD-Spektren	40
3.15 NMR-Spektroskopie	41
3.15.1 Probenvorbereitung	41
3.15.2 Geräte und Messbedingungen	41
3.15.3 NMR-Experimente	42
3.15.4 Prozessierung der NMR-Spektren	46
3.15.5 Analyse der NMR-Spektren	46
3.15.5.1 Zuordnung der Resonanzen	46
3.15.5.2 Analyse der Sekundärstruktur nach Wishart	49
3.16 Strukturberechnung	49
3.16.1 Computer Hard- und Software	49
3.16.2 Experimentelle Randbedingungen	50
3.16.2.1 Distanzbeschränkungen aus NOE-Kreuzresonanzen	50
3.16.2.2 Einschränkung der Diederwinkel durch ^3J -Kopplungskonstanten	51
3.16.2.3 Abstandsbeschränkungen aus Wasserstoffbrücken	52
3.16.3 Berechnung der Strukturen nach dem Prinzip des <i>simulated annealing</i>	53
3.16.3.1 Berechnung einer geometrisch korrekten Startstruktur	54
3.16.3.2 simulated annealing	54
3.16.3.3 Strukturanalyse	55
3.17 Komparative Molekülmodellierung	56

4 EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE	57
4.1 Klonierungen	57
4.1.1 Konstruktion der Plasmide pET-32a-EK- <i>dom15</i> und pET-32a-PreS- <i>dom15</i>	57
4.1.2 Konstruktion der Plasmide pET-32a-PreS- <i>dom15kurz</i> und pET-32a-PreS- <i>dom15ldti</i>	59
4.2 Expression und Reinigung der LEKTI-Domäne 15	60
4.2.1 Expression von Trx-EK- <i>dom15</i> und Trx-PreS- <i>dom15</i> in <i>E. coli</i> AD494(DE3) und <i>E. coli</i> Origami(DE3)	60
4.2.2 Zellaufschluss und Reinigung der Fusionsproteine Trx-EK- <i>dom15</i> und Trx-PreS- <i>dom15</i>	61
4.2.3 Spaltung der Fusionsproteine Trx-EK- <i>dom15</i> und Trx-PreS- <i>dom15</i>	62
4.2.4 Trennung von Fusionsanhang und GP <i>dom15</i>	63
4.3 Expression und Reinigung der LEKTI-Domäne 15-Varianten <i>dom15kurz</i> und <i>dom15ldti</i>	65
4.4 Biophysikalische Charakterisierung der LEKTI-Domäne 15-Varianten	68
4.4.1 Massenspektrometrie	68
4.4.2 CD-Spektroskopie	69
4.5 Untersuchung der biologischen Aktivität	72
4.5.1 Inhibierung von Trypsin	72
4.5.2 Test auf Inhibierung weiterer Proteinasen und Bestimmung der inhibitorischen Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_i	74
4.5.3 Test auf Inhibierung der HIV-Infektion	76
4.6 Strukturbestimmung von GP<i>dom15</i> / GP<i>dom15kurz</i> in Lösung	78
4.6.1 Gewinnung von Randbedingungen mittels NMR-Spektroskopie	78
4.6.1.1 Optimierung der Probenbedingungen	78
4.6.1.2 Identifizierung von Spinsystemen und sequentielle Zuordnung der Resonanzen	81
4.6.1.3 ^{15}N -editierte 3D-NMR-Experimente zum Auflösen von Signal- überlagerungen	81
4.6.1.4 Sequenzspezifische Zuordnung der Resonanzen mittels <i>chain tracing</i> in ^{15}N -editierten NOESY-Spektren	83
4.6.1.5 Vervollständigung der Zuordnung mit Hilfe von GP <i>dom15kurz</i> -Spektren .	84
4.6.2 Informationen über die sequenzspezifische Sekundärstruktur - CSI	88
4.6.3 Experimentelle Strukturinformationen	90
4.6.3.1 Einschränkung der Diederwinkel durch ^3J -Kopplungskonstanten	90

4.6.3.2 Identifizierung von Wasserstoffbrücken	90
4.6.3.3 Abstandsbeschränkungen aus NOE-Kreuzresonanzen	91
4.6.3.4 Analyse der NOE-Kreuzresonanzen	93
4.6.4 Die Prolinkonformation	95
4.6.5 Das Muster der Disulfidverbrückung von LEKTI-Domäne 15	95
4.6.6 Der heteronukleare $\{^1\text{H}\} \ ^{15}\text{N}$ NOE	97
4.6.7 Strukturberechnung auf Basis der NMR-Daten	98
4.6.8 Die Struktur von GPdom15kurz bzw. GPdom15 in Lösung	106
4.7 Die LDTI-Variante GPdom15ldti	109
4.7.1 Oxidative Rückfaltung von GPdom15ldti	111
4.7.2 Test auf Inhibierung von Serinproteinasen	113
5 DISKUSSION	116
5.1 Die Bedeutung der LEKTI-Domäne 15	116
5.2 Expression und Reinigung der LEKTI-Domäne 15-Varianten	117
5.3 Analyse der Sekundärstruktur der LEKTI-Domäne 15-Varianten mittels CD-Spektroskopie	119
5.4 Die Struktur von GPdom15 und GPdom15kurz in Lösung	122
5.5 Untersuchungen zur biologischen Funktion der LEKTI-Domäne 15-Varianten	134
6 ZUSAMMENFASSUNG	143
7 SUMMARY	145
8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	147
9 LITERATURVERZEICHNIS	150
10 ANHANG	177
10.1 Nukleotidsequenzen	177
10.1.1 Nukleotidsequenz von pET-21a-HisVak15	177
10.1.2 Nukleotidsequenz von pBlueskript II KS-EK-dom15	178
10.1.3 Nukleotidsequenz von pBlueskript II KS-PreS-dom15	178
10.1.4 Nukleotidsequenz von pBlueskript II KS-PreS-dom15kurz	179
10.1.5 Nukleotidsequenz von pBlueskript II KS-PreS-dom15ldti	180
10.2 Chemische Verschiebungen	180

10.2.1 Chemische Verschiebungen für GPdom15kurz	180
10.2.2 Chemische Verschiebungen für GPdom15	183
10.3 Experimentelle Randbedingungen für die Berechnung der Strukturen	187
10.3.1 Distanzbeschränkungen für GPdom15kurz	187
10.3.2 Distanzbeschränkungen für GPdom15	192
10.3.3 Beschränkungen der Diederwinkel aus $^3J(\text{HN}, \text{H}\alpha)$ -Kopplungskonstanten	192
10.3.4 Beschränkungen durch Wasserstoffbrücken	192
10.4 XPLOR-Protokolle	193
10.4.1 generate_structure.inp: Protokoll zum Erstellen der Strukturdateien dom15_kurz.psf bzw. dom15.psf	193
10.4.2 generate_template.inp: Protokoll zum Erstellen der Strukturdateien dom15_kurz_template.pdb bzw. dom15_template.pdb	193
10.4.3 sa_dom15.inp: <i>simulated annealing</i> Protokoll	194
10.4.4 ave_dom15.inp Protokoll	198
10.4.5 ave_plot_dom15.inp Protokoll	199
11 DANKSAGUNG	201
12 ERKLÄRUNG	202

1 Einleitung

1.1 Bedeutung von Proteinasen und Proteinase-Inhibitoren

Der größte Teil der bislang bekannten Enzyme gehört zu den Proteasen (Vanaman & Bradshaw, 1999), die Peptidbindungen hydrolysieren und daher auch als Peptidasen bezeichnet werden (Greens & Neurath, 1957). Die Endopeptidasen (= Proteinase) spalten im Gegensatz zu den Exopeptidasen nicht nur nahe der Termini von Polypeptiden und werden entsprechend dem katalytischen Mechanismus in Serin-, Cystein-, Aspartat-, Metallo- und Threoninproteinase eingeteilt (NC-IUBMB, 1992; Rawlings & Barrett, 1999). Proteinase sind in allen Organismen ubiquitär verbreitet (Neurath, 1989; Rawlings *et al.*, 2004 b) und übernehmen vielfältige, meist essentielle Funktionen (Barrett *et al.*, 2001). So fungieren sie beispielsweise als Aktivatoren für Enzymkaskaden, setzen Hormone aus inaktiven Vorstufen frei oder aktivieren Rezeptoren (Neurath, 1984). Für eine gewollte und nützliche Wirkung der Proteinase bedarf es aber einer effizienten Kontrolle (Laskowski & Qasim, 2000). Dies kann beispielsweise durch Regulierung der Expression bzw. Sekretion des Enzyms, durch Bildung einer inaktiven Vorstufe (Zymogen), die erst bei Bedarf aktiviert wird, und/oder über Inaktivierung der Proteinase mittels spezifischen Abbaus bzw. spezifischer Hemmung durch Inhibitoren erfolgen (Khan & James, 1998). Soweit bekannt, handelt es sich bei den endogenen Inhibitoren um Proteine (Bode & Huber, 2000), die unterschiedliche Struktur bzw. Faltungsmotive aufweisen können (Laskowski *et al.*, 2000; Otlewski *et al.*, 1999) und meist nur gegenüber einer Proteinasefamilie inhibitorisch aktiv sind (Krowarsch *et al.*, 2003).

Auch beim Menschen beruhen viele Erkrankungen auf einer Störung des regulatorischen Zusammenspiels von Proteinase und Inhibitor. Gerade bei genetischer Ursache wirkt sich eine solche Fehlregulation dramatisch auf den Gesundheitszustand und damit auf die Lebensqualität der Betroffenen auf Lebenszeit aus, wie beispielsweise bei chronischer Pankreatitis (Bhatia *et al.*, 2002; Witt *et al.*, 2000), familiärem Lungenemphysem (Eriksson, 1996; Lomas & Parfrey, 2004; Lomas *et al.*, 2002), Epilepsie (Lehesjoki, 2003) oder hereditärem angioneurotischen Ödem (Ritchie, 2003). Proteinaseinhibitoren spielen aber auch bei weiter verbreiteten Erkrankungen wie Krebs (Kobayashi *et al.*, 2004; Sun & Yang, 2004), Alzheimer und Parkinson (Crowther, 2002) oder AIDS (*acquired immunodeficiency syndrome*; De Clercq, 2004) und anderen Viruserkrankungen wie Grippe (Kido *et al.*, 1999) oder SARS (*severe acute respiratory syndrome*; Yamamoto *et al.*, 2004; Fujii *et al.*, 2004) eine wichtige Rolle, worin sich das große pharmakologische Interesse an natürlichen aber auch an künstlich hergestellten Proteinase-Inhibitoren begründet (Deadman, 2000; Seife, 1997). Noch im Anfangsstadium befin-

det sich der Ansatz, den benötigten Inhibitor mittels Gentherapie dauerhaft zu applizieren (Krol *et al.*, 2003; McKay *et al.*, 2003), während beispielsweise bei genveränderten Nutzpflanzen eine Resistenz gegenüber den Proteinasen von Schädlingen durch Expression von Inhibitoren bereits erreicht wird (Samac & Smigocki, 2003; Telang *et al.*, 2003).

1.2 Strukturelle Charakteristika kleiner „kanonischer“ Serinproteinase-Inhibitoren

Die Inhibitoren werden üblicherweise nach dem katalytischen Mechanismus der Zielproteinase in Klassen und basierend auf Sequenzhomologie, Anzahl und Muster der Disulfidverbrückungen, Bindungsmechanismus und strukturellen Gemeinsamkeiten in Familien eingeteilt (Laskowski & Kato, 1980; Bode & Huber, 1992; Laskowski *et al.*, 2000). Ein neuer Ansatz zur Einteilung ging mit der Erfassung der Proteinaseinhibitoren in einer zentralen Datenbank (<http://merops.sanger.ac.uk>) einher, bei der die Inhibitoren zunächst auf Basis der Aminosäuresequenz in Familien geordnet und dann unter Berücksichtigung der dreidimensionalen Struktur in *Clans* zusammengefasst werden (Barett *et al.*, 2001; Rawlings & Barett, 1999; Rawlings *et al.*, 2004 a, b).

Die Inhibierung von Proteasen erfolgt meist durch eine direkte Blockierung des aktiven Zentrums, indem der Inhibitor auf eine dem Substrat analoge Weise bindet, die auch als Standardmechanismus bezeichnet wird (Huber & Bode, 1978; Laskowski & Kato, 1980). In manchen Fällen wird ferner eine indirekte Blockierung des aktiven Zentrums durch Bindung an eine dem aktiven Zentrum benachbarte Stelle und/oder zusätzlicher Bindung an der Molekülußenseite (*exosite binding*), sowie die Inhibierung durch allosterische Wechselwirkung beobachtet (Bode & Huber, 2000).

Auch die meisten Serinproteinase-Inhibitoren, die bislang üblicherweise in 18 Familien unterteilt wurden (Laskowski *et al.*, 2000) und die größte und bedeutendste Klasse darstellen (Krowarsch *et al.*, 2003), inhibieren nach dem Standardmechanismus. Typische Vertreter bestehen aus einer inhibitorischen Domäne, die 29 bis 129 Aminosäuren groß ist (Bode & Huber, 1992). Es werden aber auch Proteine gefunden, die bis zu 15 potentiell inhibitorisch wirksame Einheiten aufweisen (Rawlings 2004 a). So besteht beispielsweise der Ovomuroid-Inhibitor aus drei (Catterall *et al.*, 1980), der Ovoinhibitor aus sieben (Scott *et al.*, 1987), der Inhibitor des Hakenwurms *Ancylostoma caninum* aus 12 (Hawdon *et al.*, 2003) und LEKTI aus 15 Domänen (Kap. 1.4; Mägert *et al.*, 1999). Auch gibt es einige wenige Vertreter, die aus Domänen mit verschiedenartigen Inhibitoren bestehen, wie beispielsweise das sogenannte

WFIKKN-Protein (Trexler *et al.*, 2001, 2002). Bei diesem weisen drei der fünf Domänen eine Ähnlichkeit gegenüber verschiedenen Proteinase-Inhibitorfamilien auf. So sind zwei Domänen der Serinproteinase-Inhibitorfamilie und eine der Metalloproteinase-Inhibitorfamilie homolog (Trexler *et al.*, 2001, 2002).

Die Inhibitoren besitzen eine oder mehrere Disulfidbrücken und bilden meist einen hydrophoben Kern aus, der oftmals über die Disulfidbrücken fixiert und orientiert wird (Krowarsch *et al.*, 2003). Dadurch erhalten die Inhibitoren eine hohe Stabilität, so dass einige Vertreter selbst bei Temperaturen von 90° C oder in 6 M Guanidiumhydrochlorid nicht denaturieren (Krokozynska & Otlewski, 1996). Eine andere Strategie zur Erhöhung der Stabilität zeigt beispielsweise der Trypsininhibitor SFTI (*sun flower trypsin inhibitor*) aus der Sonnenblume (*Helianthus annuus*), der als kleines, 14 Aminosäuren umfassendes, über ein zyklisches Proteinerückgrat und eine Disulfidbrücke stabilisiertes Protein vorliegt (Korsinczky *et al.*, 2001).

Trotz völlig unterschiedlicher Faltungsmotive haben die Inhibitoren eine exponierte Bindungsschleife mit nahezu gleicher Geometrie gemeinsam. Die inhibitorische Schleife zeigt außer für den Rest in P1-Position, der eine 3_{10} -helikale Konformation einnimmt, eine gestreckte Proteinerückgratgeometrie, so dass alle Reste außer in P3-Position vom eigentlichen Inhibitor weg orientiert sind (Bode & Huber, 1992). Bei den kanonischen (*canonical*) Inhibitoren verändern sich die charakteristischen Rückgrat-Torsionswinkel auch bei Bindung an die Proteinase nur kaum (Otlewski *et al.*, 2001), wobei die Wechselwirkung mit dem katalytischen Rest der Proteinase stets über eine bestimmte exponierte Peptidbindung erfolgt (Ardelt & Laskowski, 1985; Bigler *et al.*, 1993; Lu *et al.*, 1997), die den Bezugspunkt für die Nomenklatur nach Schechter und Berger (1967) darstellt. Danach werden die in Richtung NH₂-Terminus an die zu hydrolysierende Bindung angrenzenden Aminosäuren entsprechend mit P1, P2, P3, usw. sowie die in Richtung COOH-Terminus mit P1', P2', P3' usw. bezeichnet (Abb. 1.1).

Da die inhibitorische Schleife meist über eine Disulfidbrücke in P3- oder P2-Position (Apostoluk & Otlewski, 1998) oder nicht-kovalente Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen mit dem übrigen Protein verbunden ist und so stabilisiert wird (Krowarsch *et al.*, 2003), bleibt die Konformation auch bei gespaltenen Inhibitoren weitgehend erhalten, wie Untersuchungen mittels NMR-Spektroskopie (Walkenhorst *et al.* 1994; Song & Markley, 2003) bzw. Röntgenkristallographie ergaben (Betzel *et al.*, 1993; Musil *et al.*, 1991; Shaw *et al.*, 1995). Lediglich die P1- und P1'-Reste biegen sich etwas auf, und gespaltene Inhibitoren

denaturieren dann bei geringerer Temperatur (Bode & Huber, 1992).

1.3 Wechselwirkung zwischen Proteinase und inhibitorischer Schleife

Im Komplex mit der Proteinase kommt es zur Ausbildung eines kurzen antiparallelen Faltblattes zwischen den Resten in P1- bis P3-Position und denen der Proteinase (Laskowski & Qasim, 2000) sowie weiterer zahlreicher Kontakte, ohne dass größere konformationelle Änderungen von Inhibitor oder Proteinase festgestellt werden (Abb. 1.1).

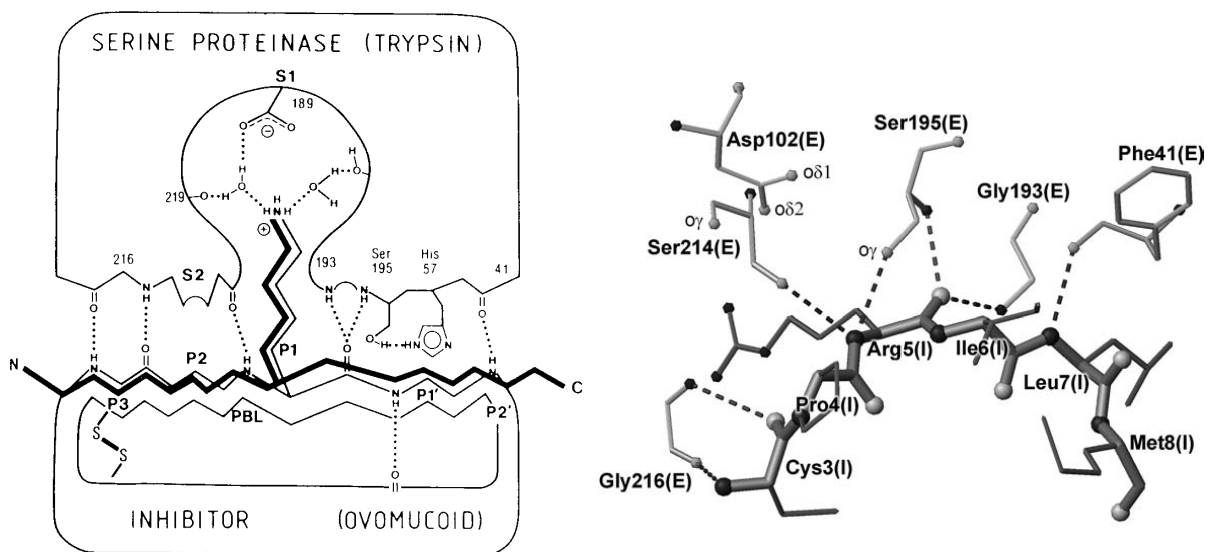


Abb. 1.1: Schematische Darstellungen der Wechselwirkung zwischen inhibitorischer Schleife und der Serinproteinase Trypsin

links: Die inhibitorische Schleife des Ovomucoid-Inhibitors bindet ähnlich wie ein Substrat (dicke Linie) an Trypsin, wobei sich mehrere Wasserstoffbrücken zwischen den Proteinrückgratatomen (punktierte Linien) und eine antiparallele β -Faltblattstruktur zwischen den Resten P3-P1 und 216-218 von Trypsin ausbilden (aus Bode & Huber, 1992); *rechts:* eine entsprechende Anordnung der Bindungsschleife (Cys3(P3)-Met8(P3')) findet sich für den Inhibitor CMTI-1 (*cucurbita maxima trypsin inhibitor*) aus Kürbis (*Cucurbita maxima*; dunkelgrau) im Komplex mit Trypsin (hellgrau; PDB: 1ppe); die Stickstoffatome sind dunkelgrau und Sauerstoffatome hellgrau eingefärbt; E = Enzym; I = Inhibitor (aus Krowarsch *et al.*, 2003).

So bilden bei einer Kontaktfläche von etwa 900 \AA^2 ca. 10-18 Aminosäuren des Inhibitors und ca. 17-30 Reste der Proteinase etwa 100 van der Waals-Kontakte und etwa 8-15 Wasserstoffbrücken aus (Otlewski *et al.*, 2001). Für das Carbonylkohlenstoffatom des P1-Restes, der über das Carbonylsauerstoffatom durch zwei Wasserstoffbrücken zu Gly193.HN und Ser195.HN (Nummerierung für Trypsin) und über das Amidproton durch zwei Wasserstoffbrücken zu den Sauerstoffatomen der Seitenketten von Ser195 und Ser214 (Nummerierung für Trypsin)

fixiert ist, wird dabei stets ein „sub-van der Waals“-Abstand von etwa 2,7 Å zu dem γ -Sauerstoffatom des katalytischen Serins 195 beobachtet (Krowarsch *et al.*, 2003).

Wie durch Mutationsstudien festgestellt wurde (Buczek *et al.*, 2002; Helland *et al.*, 1999), sind für die Affinität und damit für die Fähigkeit zur Inhibierung weniger die Kontakte oder die Art der Seitenketten sondern in erster Linie die Konformation und die Wechselwirkungen des Proteinrückgrats der kanonischen Inhibitoren zur Proteinase ausschlaggebend (Jackson, 1999), weswegen bei Einführung einer Ester- anstelle der Amidbindung zwischen dem P1- und P1'-Rest eine geringere Affinität des Inhibitors zur Proteinase beobachtet wird (Bateman *et al.*, 2001; McPhalen & James, 1988; Takeuchi *et al.*, 2001).

Die Seitenkette der Aminosäure in P1-Position ragt in die S1-Bindungstasche der Proteinase und wechselwirkt mit der Aminosäure am Taschenende (Abb. 1.1), die aufgrund ihrer Ladung (Aspartat 189 bei Trypsin) bzw. Hydrophobizität (Serin 189 bei Chymotrypsin) die Präferenz für den P1-Rest des Inhibitors bzw. des Substrats und damit die katalytische Effektivität der Proteinase bestimmt (Czapinska & Otlewski, 1999; Evnin *et al.*, 1990; Otlewski *et al.*, 2001; Schellenberger *et al.*, 1991). Während der über die zahlreichen Wechselwirkungen stabilisierte Proteinase-Inhibitor-Komplex auch nach Spaltung des intrinsisch stabilisierten Inhibitors bestehen bleibt und dadurch eine Resynthese der Peptidbindung ermöglicht (Ardelt *et al.*, 1985; Marx *et al.*, 2003), werden kurze Peptide irreversibel gespalten (Okada *et al.*, 1989).

1.4 Der 15-Domänen Serinproteinase-Inhibitor LEKTI

1999 wurden aus menschlichem Hämofiltrat zwei 68 bzw. 55 Aminosäuren große und bis dahin unbekannte Proteine isoliert, die entsprechend ihrer Herkunft und Molekulargewicht als HF7665 und HF6478 (*hemofiltrate*, 7665 bzw. 6478 Da) bezeichnet wurden (Mägert *et al.*, 1999). Sie wurden als Teile eines 1064 Aminosäuren großen Vorläuferproteins identifiziert, das aufgrund des vornehmlichen Expressionsgewebes (Mundschleimhaut, Thymus, Vaginal-epithel, Bartholin-Drüsen, Nebenschilddrüsen, Tonsillen) und der Ähnlichkeit des Cysteinstusters zu dem der Serinproteinase-Inhibitorenfamilie vom Kazaltyp (Kazal *et al.*, 1948; Greene & Bartelt, 1969) als LEKTI (*lympho-epithelial Kazal-type-related inhibitor*) bezeichnet wurde (Mägert *et al.*, 1999). Nach Sequenzanalyse wurde das LEKTI-Protein in ein kurzes Signalpeptid sowie in 15 ihrer Aminosäuresequenz nach homologe Domänen eingeteilt, von denen zwei Domänen (Domäne 2 und 15) drei Disulfidbrücken mit vermutetem Kazal-typischen Verbrückungsmuster (1-5/2-4/3-6; Abb. 1.2) besitzen. Für die anderen 13 Domänen, denen das dritte und sechste Kazal-typische Cystein fehlen, wird ein analoges Verbrückungs-

muster (1-4/2-3; Abb. 1.2) erwartet, nachdem dies für Domäne 1 (HF 6478; Lauber *et al.*, 2003) und 6 (HF7665; Mägert *et al.*, 1999) experimentell nachgewiesen werden konnte. Im Gegensatz zu klassischen Kazalinhhibitoren weisen die LEKTI-Domänen dreizehn, bzw. zwölf statt den üblichen sechs Aminosäuren (Greene & Bartlet, 1969; Kazal *et al.*, 1948) zwischen den ersten beiden Cysteinen auf. Dennoch sollte es sich aufgrund der großen Sequenzhomologie auch bei den Domänen 3-14 um Serinproteinase-Inhibitoren handeln, nachdem für Domäne 6 eine effiziente aber temporäre Hemmung von Trypsin festgestellt wurde (Abb. 1.2; Mägert *et al.*, 1999). Die fehlende inhibitorische Wirkung von Domäne 1 kann auf eine „Bindungsschleife“ ohne kanonische Konformation zurückgeführt werden, wie aus der Struktur hervorgeht (Lauber *et al.*, 2003).

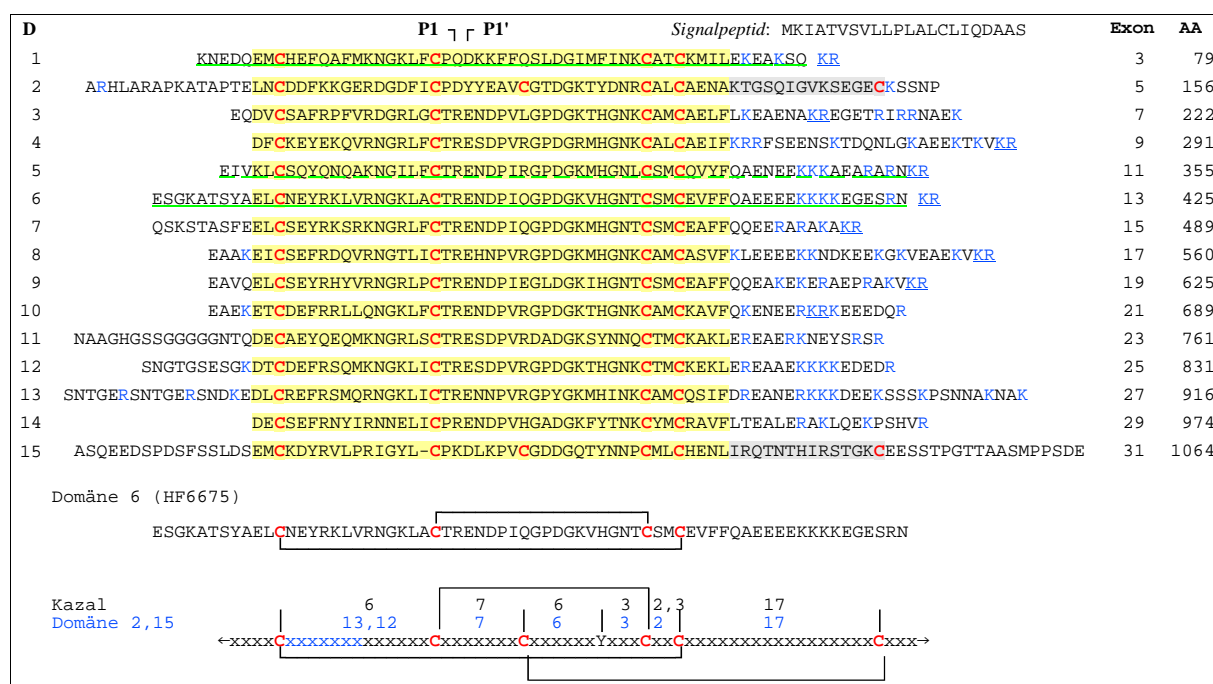


Abb. 1.2: Sequenzbasierte Einteilung von LEKTI in Domänen

Sequenzvergleich und Einteilung von LEKTI in Domänen anhand des Cysteinmusters und möglicher Prozessierungsstellen für Subtilisin-ähnliche Proprotein-Konvertasen (K/R-(Xaa)_n-K/R↓ bzw. Furin (R-Xaa-KR↓; Xaa = beliebige Aminosäure; n = 0, 2, 4, oder 6); in der Linkerregion sind Lys und Arg in blau und KR-Motive zusätzlich unterstrichen; der Sequenzbereich von Domäne 1, 5 und 6 ist grün unterstrichen; die für die zentrale Inhibitorsequenz kodierenden Exons sind gelb und der für Kazalinhhibitoren notwendige weitere Abschnitt grau hinterlegt; Nummerierung der Domänen (D), Exons und Aminosäuren (AA) wie in der Literatur beschrieben (Komatsu *et al.*, 2002; Mägert *et al.* (1999); die potentielle P1-P1'-Position ist angegeben; Vergleich der Verbrückungsmuster von Domäne 6 (nachgewiesen) sowie von Domäne 2 (vermutet) bzw. 15 (diese Arbeit) mit typischer Kazalsequenz.

Nur kurze Zeit nach der Entdeckung von LEKTI zeigten Chavanas *et al.* (2000 a, b), dass LEKTI vom sogenannten SPINK5-Gen (*serine protease inhibitor kazal-type 5*) kodiert wird und dass es bei Patienten mit Netherton Syndrom aufgrund von Mutationen im SPINK5-Gen zu einem vorzeitigen Stop der Translation kommt. Beim Netherton Syndrom handelt es sich um eine schwere autosomal-rezessive Erbkrankheit mit Symptomen wie Verhornungsstörungen der Haut (*Ichthyosis linearis circumflexa*), leicht brüchiges, sogenanntes Bambus-Haar (*trichorrexis invaginata*), Hypereosinophilie, hohen Blutkonzentrationen an Immunglobulin E (IgE), Heuschnupfen oder Prädisposition für Asthma (weitergehende Informationen in: Bitoun *et al.*, 2002 a, b; Comèl, 1949; Netherton, 1958; Sprecher *et al.*, 2001). Auch bei allen weiteren genetisch untersuchten Patienten mit Netherton Syndrom wurden solche Mutationen, die in einem vorzeitigen Stop-Codon resultieren, festgestellt, wobei vor allem die Exons 2-8 und 21-26 des in 33 Exons organisierten SPINK5-Gens betroffen sind (Bitoun *et al.*, 2002 b; Chavanas *et al.*, 2000). Damit wurde das Netherton Syndrom mit einem nicht vollständig gebildeten LEKTI-Protein in direkten Zusammenhang gebracht, welcher von Bitoun *et al.* (2003) dadurch bestärkt werden konnte, dass LEKTI mittels Antikörper gegen den Carboxyterminus in Hautzellen von Patienten mit Netherton Syndrom im Gegensatz zu denen von gesunden Probanden nicht nachgewiesen werden konnte.

Inzwischen wurde das alle 15 Domänen umfassende *full-length*-LEKTI rekombinant hergestellt und auf seine inhibitorische Aktivität gegenüber verschiedenen Serinproteinasen *in vitro* getestet (Mitsudo *et al.*, 2003). Zwar hemmt es Trypsin neben einigen weiteren Serinproteinasen (Subtilisin, Cathepsin G, Elastase; Mitsudo *et al.*, 2003) ähnlich stark wie die aus natürlichem Material isolierten Domänen 6 und 5 (Mägert *et al.*, 1999, 2002 a) bzw. wie das rekombinant gewonnene LEKTI-Fragment 6-9', das die Domänen 6-8 komplett und von der 9. Domäne die erste Hälfte umfasst (Glu356-Asn598, vgl. Abb. 1.2; Jayakumar *et al.*, 2004). Dennoch sprechen etliche Befunde dafür, dass es *in vivo* zunächst als Vorläuferprotein gebildet und dann in einzelne Domänen gespalten wird, wie es auch für das Mehrdomänen-Vorläuferprotein eines Inhibitors der Tabakpflanze (*nicotiana glauca*) beschrieben wird (Nielsen *et al.*, 1994; Schirra *et al.*, 2001). Komatsu *et al.* (2002) stellten hierzu eine Hypothese über die Spaltung des LEKTI-Vorläuferproteins durch Subtilisin-ähnliche Proprotein-Konvertasen SPCs (*Subtilisin like Proprotein Convertase*) und über die Funktion der 14 einzelnen auf diese Weise freigesetzten Domänen auf. Gestützt auf Ergebnisse, dass in der oberen Hautschicht (*stratum corneum*) von Patienten mit Netherton Syndrom eine erhöhte Trypsinaktivität festzu-

stellen ist (Komatsu *et al.*, 2002), sollen dem Modell entsprechend die inhibitorisch wirkenden LEKTI-Domänen einen unkontrollierten Abbau des Zell-Zell-verbindenden Proteins Desmoglein 1 aus der Gruppe der desmosomalen Cadherine (Suzuki *et al.*, 1996) durch in der Hornhaut lokalisierte Trypsin- (*stratum corneum trypsin-like enzym*, SCTE) und Chymotrypsin-artige Proteinasen (*stratum corneum chymotrypsin-like enzym*, SCCE) verhindern. Bei Patienten mit Netherton Syndrom könnte damit aufgrund der verringerten LEKTI-Menge die unzureichende Inhibierung von SCTE und SCCE bzw. Kallikreinen (vgl. Diskussion Kap. 5.8) die Ursache eines der Hauptsymptome, eine übermäßig starke Hautschuppung (*Ichthyosis linearis circumflexa*), und die dadurch bedingte Anfälligkeit für Infekte aufgrund der gestörten natürlichen Schutzfunktion der Haut darstellen (Komatsu *et al.*, 2002).

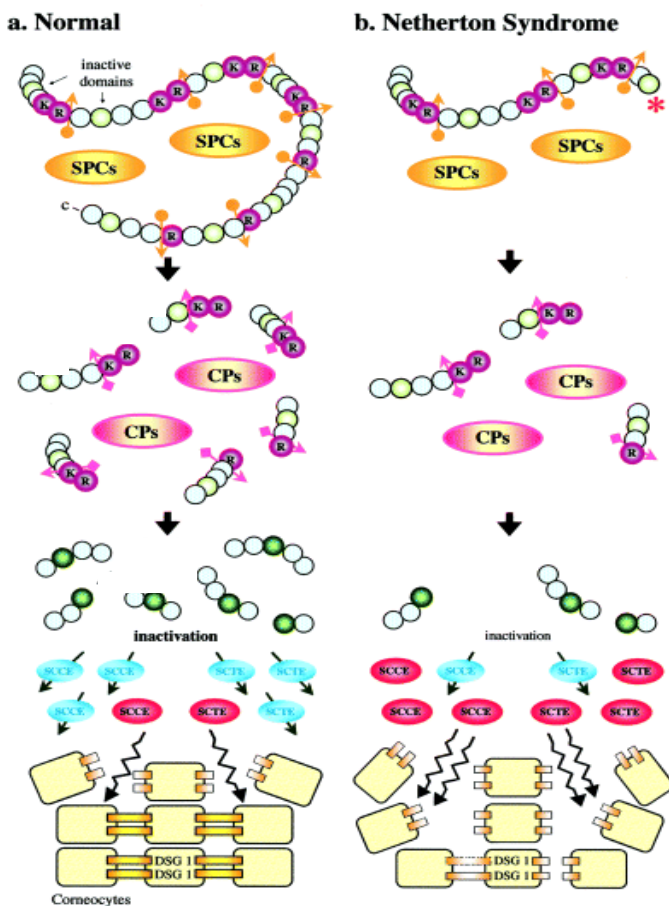


Abb. 1.3: Modell zur Regulation der Hautschuppung durch LEKTI

(a) In normaler Haut wird das Vorläuferprotein LEKTI durch von Korneozyten gebildete, Subtilisin-ähnliche Proprotein-Konvertasen (SPCs) gespalten ($(K/R-(Xaa)_n-K/R \downarrow$; Xaa = beliebige Aminosäure; $n = 0, 2, 4$, oder 6) und anschließend durch Carboxypeptidasen (CPs) weiter prozessiert; die einzelnen Domänen inhibieren dann die Proteinasen SCTE und SCCE (*stratum corneum tryptic* bzw. *chymotryptic enzyme*), die die oberste Korneozytenschicht durch Spaltung von Desmoglein 1 (DSG1) ablösen; (b): In der Haut von Patienten mit Netherton Syndrom wird aufgrund von Mutationen mit vorzeitigem Translationsstop nur ein verkürztes LEKTI-Protein gebildet, das eine erhöhte Proteinaseaktivität und damit eine erhöhte Hautabschuppung zur Folge hat (verändert, aus Komatsu *et al.*, 2002).

Die Vermutung hinsichtlich einer Prozessierung durch SPCs wird durch die Ergebnisse von Bitoun *et al.* (2003) bekräftigt, die zeigten, dass das komplette, offensichtlich glykosylierte LEKTI-Protein schnell prozessiert wird und nach Verlassen des Endoplasmatischen Retikulums in wenigstens drei (42, 65 und 68 kDa) großen Fragmenten vorliegt. Bei Anwesenheit eines Hemmstoffes gegen Furin (SPC1), einen Vertreter der SPCs, wurde hingegen keine

Fragmentierung beobachtet (Bitoun *et al.*, 2003). Jayakumar *et al.* (2004) identifizierten nach Koexpression des LEKTI-Proteins und Furin sechs (110, 75, 50, 45, 35, 25 kDa große) Fragmente, während Mitsudo *et al.* (2003) nach Umsetzung von LEKTI mit Furin 13 verschiedene (6,0 - 8,5 kDa) große Fragmente mittels MALDI-Massenspektrometrie detektieren konnten. Außerdem ist von SPCs bekannt, dass diese in der Haut vorkommen (Pearson *et al.*, 2001) und hauptsächlich im trans-Golgi Netzwerk lokalisiert sind (Nakayama, 1997) sowie auch aus anderen Vorläuferproteinen die aktive Form freisetzen (z.B. Duguay *et al.*, 1997; Hatsuzawa *et al.*, 1992; Logeat *et al.*, 1998). Da die SPCs spezifisch nach der Erkennungssequenz K/R-(Xaa)_n-K/R↓ bzw. im Fall von Furin nach R-Xaa-KR↓ (Xaa = beliebige Aminosäure; n = 0, 2, 4, oder 6) spalten (Hosaka *et al.*, 1991; Seidah & Chrétien, 1992) und bei LEKTI alle Linkerregionen bis auf die zwischen Domäne 2 und 3 ein derartiges Sequenzmotiv aufweisen (Abb. 1.2), ist eine Prozessierung des LEKTI-Vorläuferproteins in 14 einzelne Domänen durch Subtilisin-ähnliche Proprotein-Konvertasen sehr wahrscheinlich. Bereits Walley *et al.* (2001) vermuteten die zahlreichen basischen Reste (Lys, Arg) in den Linkerregionen zwischen den Bereichen mit konserviertem Cysteinmuster als mögliche Prozessierungsstellen.

Auch würde eine LEKTI-Prozessierung durch SPCs bzw. insbesondere durch Furin das Vorkommen der Domänen 1, 5 und 6 als eigenständige Proteine (Mägert *et al.*, 1999, 2002 a, b) sowie deren tatsächlich beobachteten Sequenzbereich erklären (Abb. 1.2), wobei dem Modell von Komatsu *et al.* (2002) entsprechend das resultierende carboxyterminale KR-Motiv durch nachweislich in dieser Hautschicht exprimierte Carboxypeptidasen abgetrennt werden könnte (Abb. 1.3). Der Vorschlag (Komatsu *et al.*, 2002), wonach die einzelnen Domänen erst durch die Einwirkung der Carboxypeptidasen ihre inhibitorische Aktivität erlangen, bleibt ohne nähere Begründung wenig nachvollziehbar.

Für die Domäne 5 wird zwar keine Primärsequenz angegeben (Mägert *et al.*, 2002 a), diese kann aber in Anlehnung an die bisherige Nomenklatur (Mägert *et al.*, 1999) abgeleitet werden. Demnach würde das als HF7072 bezeichnete und 62 Reste umfassende LEKTI-Fragment (Mägert *et al.*, 2002 a) dem Sequenzbereich E292 bis N353 entsprechen, für den bei Ausbildung der beiden Disulfidbrücken eine theoretische Masse von 7072 Da zu erwarten wäre (Abb. 1.2; <http://www.expasy.org>; Gasteiger *et al.*, 2003) und der wie angegeben (Mägert *et al.*, 2002 a) ein Valin an Sequenzposition 44 aufweisen würde. Auch für den Beginn der Domäne 8 würde die dann zu erwartende Aminosäureabfolge mit der mittels aminoterminaler Sequenzierung bestimmten übereinstimmen (Ahmed *et al.*, 2001).

Die Hinweise auf eine mögliche Prozessierung von LEKTI *in vivo* zusammen mit der vorgeschlagenen Regulierung von SCCE und SCTE (Komatsu *et al.*, 2002) stellen eine erste konkrete Ableitung der physiologischen Rolle dar, mit der auch die starke Expression von LEKTI in der Haut (Bitoun *et al.*, 2003) erklärt werden kann.

Aufgrund der vielfältigen weiteren mittels Antikörper-Technik nachgewiesenen Expressionsorte wie Thymus, Mundschleimhaut, Tonsillen oder Vaginalepithel (Bitoun *et al.*, 2003; Mägert *et al.*, 2003), werden etliche Vorschläge über weitere mögliche physiologische Funktionen von LEKTI diskutiert. So könnte LEKTI gegen externe Serinproteinasen gerichtet sein (Moffatt, 2004), da die Haut von Patienten mit atopischer Dermatitis von *Staphylococcus aureus* Stämmen mit verstärkter proteolytischer Aktivität besiedelt ist (Miedzobrodzki *et al.*, 2002) und für manche Allergene wie beispielsweise die der Hausstaubmilbe (*Dermatophagoides farinae*) neben einer IgE-Bindungsfähigkeit auch eine Wirkung als Serinproteinase festgestellt wurde (Bagarozzi *et al.*, 1998; Kawamoto *et al.*, 1999, 2002; Thomas *et al.*, 2002). Da für einige andere Serinproteinase-Inhibitoren bereits antimikrobielle und antivirale Eigenschaften beschrieben wurden (Sallenave, 2002), wie beispielsweise für den Antileukoproteinase-Inhibitor SLPI (*secretory leukocyte proteinase inhibitor*), der SCCE inhibiert (Franzke *et al.*, 1996) und ebenso wie LEKTI in der Mundschleimhaut vorkommt (Wiedow *et al.*, 1998), wäre für LEKTI eine ähnliche Abwehrfunktion denkbar (Mitsudo *et al.*, 2003).

Ferner legt die starke Expression von LEKTI in den sogenannten Hassall Körperchen im Thymus eine Funktion bei der Regulation von Reifung und Aktivierung der T-Zellen nahe (Bodey *et al.*, 2000; Douek & Altmann, 2000), obgleich keine signifikanten Unregelmäßigkeiten in der Immunfunktion bei Patienten mit Netherton Syndrom beobachtet werden (Judge *et al.*, 1994). Bitoun *et al.* (2002 b) schlagen das Trypsin-artige Kallikrein 6 (Petraki *et al.*, 2001) als mögliche Zielproteinase vor. Auch der Umfang der atopischen Manifestation bei Patienten mit Netherton Syndrom, die bei anderen erblichen Ichthyosen nicht beobachtet wird (Cookson & Moffatt, 2000; Walley *et al.*, 2001; Kato *et al.*, 2003) sowie spezifische Bindungsstellen in der Promotorregion des LEKTI-Gens u.a. für Lymphozyten-spezifische Transkriptionsfaktoren (Molnar & Georgopoulos, 1994) und eine Interleukin-6 Zellantwort (Baumann *et al.*, 1992) deuten auf eine Beteiligung bei der Immunantwort hin (Mägert *et al.*, 2002 b; Walden *et al.*, 2002).

Eine weitere mögliche Zielprotease stellt die Membran-Typ Serinproteinase 1 (*membrane-type serine protease 1*), ein Typ II Transmembranprotein mit extrazellulärer Proteinasedomä-

ne, dar (Takeuchi *et al.*, 2002), die über Aktivierung des auf der Keratinozytenoberfläche lokalisierten Protease-aktivierten Rezeptors PAR-2 (*protease-activated receptor-2*) eine Inhibition der Keratinozytendifferenzierung bzw. Keratinisierung vermittelt (Derian *et al.*, 1997). Die PAR-Familie umfasst vier verschiedene Typen, ist membrangebunden und zählt zu den G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Sie ist an Abwehr- und Entzündungsprozessen beteiligt und kann mittels proteolytischer Spaltung durch Trypsin, Thrombin, Tryptase und Cathepsin G aktiviert werden (Berger, 2000; Dery *et al.*, 1998; Hollenberg, 2003; Kanke *et al.*, 2001; Macfarlane *et al.*, 2001; Vergnolle *et al.*, 2001). Nachdem Tryptase über PAR-2 die Sekretion inflammatorischer Cytokine steigert (Hou *et al.*, 1998), Mastzellen aktiviert (He *et al.*, 1998) sowie eosinophile und neutrophile Zellen zur Teilung anregt (He *et al.*, 1997) und damit eine generelle Verstärkung der Immunantwort auf eine Entzündung bewirkt (Schechter *et al.*, 1998), könnten einige der beim Netherton Syndrom beobachteten Symptome (Hypereosinophilie, hohe IgE-Konzentrationen im Blut, Heuschnupfen) Folge einer unzureichenden Regulierung der Tryptaseaktivität sein (Mägert *et al.*, 2002 a). Da Tryptase außerdem einen Mediator für Asthma darstellt (Rice *et al.*, 1998) und Patienten mit Netherton Syndrom eine Prädisposition für Asthma zeigen, wäre für LEKTI bzw. einzelne Domänen auch aufgrund dieser Übereinstimmung eine hemmende Wirkung gegenüber Tryptase denkbar (Mägert *et al.*, 1999, 2002 b). Diese Vermutung wird dadurch bestärkt, dass ein Polymorphismus im LEKTI-kodierenden Gen auch bei Kindern ohne Netherton Syndrom mit Atopie und Ekzemen sowie Asthma assoziiert ist (Cookson & Moffat 2000; Walley *et al.*, 2001). Dies hat eine kürzlich erst veröffentlichte und statistisch gut abgesicherte Studie für den Polymorphismus Glu420Lys bestätigt (Kabesch, 2004). Da sich Glu420 in dem COOH-terminalen Bereich von Domäne 6 befindet, sollte die Mutation Glu420Lys keinen direkten Einfluss auf die Struktur von Domäne 6 nehmen, wobei nachteilige Auswirkungen auf die Prozessierung von LEKTI jedoch nicht ausgeschlossen werden können (Lauber *et al.*, 2003).

Ein Sequenzvergleich der einzelnen LEKTI-Domänen mit dem bislang einzigen bekannten natürlich vorkommenden Tryptase-Inhibitor aus dem medizinischen Blutegel (*Hirudo medicinalis*; Auerswald *et al.*, 1994) LDTI (*leech derived tryptase inhibitor*) hat gezeigt, dass die Domäne 15 signifikante Homologien vor allem im Bereich der Bindungsschleife aufweist (Sommerhoff *et al.*, 2000). Da eine Korrelation zwischen der Länge des noch gebildeten LEKTI-Proteins (Genotyp) und dem Schweregrad der Symptomatik (Phänotyp) nicht abgeleitet werden konnte (Bitoun *et al.*, 2002 b; Sprecher *et al.*, 2001), und, soweit bekannt, bei allen

Patienten mit Netherton Syndrom die 15. Domäne des LEKTI-Proteins nicht gebildet wird (Bitoun *et al.*, 2002 b), wirft dies die Frage nach dem Zusammenhang zwischen dieser nicht exprimierten Domäne und dem Krankheitsbild auf und lässt eine zentrale Bedeutung der LEKTI-Domäne 15 beim Netherton Syndrom vermuten.

2 Ziele

Nachdem bei allen bisher genetisch untersuchten Patienten mit Netherton Syndrom Mutationen im LEKTI-Gen gefunden wurden, die zu einer vorzeitigen Termination der Translation des 15 Domänen umfassenden Inhibitors LEKTI führen, ist von einer zentralen Bedeutung insbesondere der letzten Domänen bei der Ausprägung des Krankheitsbildes dieser autosomal-rezessiven Erbkrankheit auszugehen.

Die Symptome des Netherton Syndroms legen einen Zusammenhang mit einer Fehlregulation der Tryptaseaktivität nahe, da die Serinproteinase Tryptase bei vielen Entzündungsprozessen und allergischen Reaktionen, aber auch bei Asthma eine zentrale Rolle spielt und durch die Korrelation von Asthma bzw. Atopie und Polymorphismen im LEKTI-kodierenden Gen auch bei nicht am Netherton Syndrom erkrankten Probanden bestärkt wird.

Da ein Sequenzvergleich der einzelnen LEKTI-Domänen mit dem bislang einzigen bekannten natürlich vorkommenden Tryptase-Inhibitor LDTI gezeigt hat, dass die Domäne 15 signifikante Homologien vor allem im Bereich der Bindungsschleife aufweist, sollte die 15. LEKTI-Domäne, die bei bislang allen genetisch untersuchten Patienten mit Netherton Syndrom fehlt, in dieser Arbeit strukturell und funktionell näher charakterisiert werden.

Die Struktur soll zum Verständnis der gewonnenen Ergebnisse aus den Untersuchungen zur inhibitorischen Wirkung Erkenntnisse beitragen. Außerdem soll die Struktur Aufschluss darüber geben, ob die LEKTI-Domäne 15 trotz des um sechs Aminosäuren größeren Abstandes zwischen den ersten beiden Cysteinen als typischer Kazalvertreter eingeordnet werden kann, da ein Inhibitor vom Kazaltyp mit einem derart langen Abschnitt zwischen den ersten beiden Cysteinen bislang strukturell noch nicht bekannt war.

Um für die strukturelle Charakterisierung und die Untersuchungen der biologischen Aktivität ausreichende Mengen (Milligramm-Maßstab) an rekombinantem, gegebenenfalls auch mit NMR-aktiven Isotopen angereicherten Protein hoher Reinheit gewinnen zu können, sollte eine effizientes Expressions- und Reinigungssystem etabliert werden. Nachdem die genaue Prozessierungsstelle zwischen Domäne 14 und 15 und damit der natürliche Sequenzbereich von Domäne 15 noch nicht bekannt ist, sollte ein zu klonierender Abschnitt gewählt werden, der auch für eine strukturelle Charakterisierung der LEKTI-Domäne 15 geeignet ist.

Im Zuge dieser Arbeit wurde eine carboxyterminal verkürzte Variante der Domäne 15 hergestellt, die eine Ableitung der Funktion dieses Sequenzabschnittes erlaubt.

Außerdem sollte neben der Untersuchung einer möglichen inhibitorischen Aktivität gegenüber Tryptase und weiterer, insbesondere der im Zusammenhang mit der Hautschuppung dis-

kutierten Serinproteinasen auch ein möglicher Einfluss auf die HIV-Replikation geprüft werden, da für LDTI nicht nur eine Tryptase-Inaktivierung beschrieben, sondern auch eine Hemmung der Replikation von HI-Viren festgestellt wurde.

Aufgrund des Einflusses von Tryptase bei vielen Entzündungsprozessen und Asthma und aufgrund der hohen Sequenzidentität von Domäne 15 und LDTI insbesondere im Bereich der inhibitorischen Schleife stellte sich die Frage, ob anti-Tryptase-Aktivität bereits vorliegt, bzw. ob durch gezielte Modifikation der LEKTI-Sequenz eine gegenüber Tryptase inhibitorisch wirksame Mutante geschaffen werden kann.

3 Materialien und Methoden

3.1 Bakterienstämme

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Bakterien handelt es sich ausschließlich um Stämme von *Escherichia coli* (*E. coli*; Tab. 3.1).

Tab. 3.1: Übersicht über Name, Genotyp und Referenz der in dieser Arbeit verwendeten *E. coli*-Stämme

<i>E. coli</i> -Stamm	Genotyp	Referenz
Top10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr</i> ⁻ , <i>hsdRMS</i> ⁻ , <i>mcrBC</i>), φ80 <i>lacZ</i> ΔM15, Grant <i>et al.</i> (1990) Δ <i>lacX74</i> , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> (Str ^R), <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	
AD494(DE3)	Δ <i>ara-leu</i> 7697, Δ <i>lacX74</i> , Δ <i>phoAPvuII</i> , <i>phoR</i> , Δ <i>malF3</i> , F'[<i>lac</i> ⁺ (<i>lacI</i> ^q) <i>pro</i>], <i>trxB::kan</i> , (DE3)	Derman <i>et al.</i> (1993)
Origami(DE3)	Δ <i>ara-leu</i> 7697, <i>araD139</i> , Δ <i>lacX74</i> , <i>galE</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> , Δ <i>phoAPvuII</i> , <i>phoR</i> , Δ <i>malF3</i> , F'[<i>lac</i> ⁻ (<i>lacI</i> ^q) <i>pro</i>], <i>gor522::Tn10</i> (Tc ^R), <i>trxB::kan</i> , (DE3)	Prinz <i>et al.</i> (1997)

***E. coli* Top10**

Der Stamm *E. coli* Top10 zeichnet sich durch eine hohe Transformationseffizienz aus und wurde zur Transformation und Gewinnung rekombinanter Plasmide eingesetzt.

Das Fehlen von Restriktions- (*hsdRMS*⁻) und Rekombinationsenzymen (*recA1*) verhindert den Abbau von Vektor-DNA bzw. die Integration von Plasmid-DNA in das Bakterienchromosom. In Kombination mit Plasmiden mit β-Galaktosidase-Gen (*lacZ*) ermöglicht der Marker φ80*lacZ*ΔM15 zudem α-Komplementation (Kap. 3.2).

***E. coli* AD494(DE3) und Origami(DE3)**

E. coli AD494(DE3) und Origami(DE3) sind Derivate des *E. coli* K-12-Stammes und wurden für die Expression von Fusionsproteinen aus Thioredoxin und LEKTI-Domäne 15-Varianten verwendet.

Eine Thioredoxin-Reduktase Defizienz (*trxB::kan*) bei beiden Stämmen, bzw. ein zusätzlicher Defekt im Glutathion-Reduktase-Gen (*gor522::Tn10* (Tc^R)) bei Origami(DE3), führt zu einem oxidativen Milieu im Cytoplasma (Derman *et al.*, 1993; Prinz *et al.*, 1997), wodurch die Ausbildung von Disulfidbrücken begünstigt wird und das sich bei der Expression von Fusionsproteinen mit Thioredoxin als vorteilhaft erwiesen hat (Kap. 3.2; LaVallie *et al.*, 1993; Stewart *et al.*, 1998). Ferner ist bei beiden Stämmen der Bakteriophage DE3, ein λ-Derivat, als Prophage in das Bakterienchromosom integriert und ermöglicht so die Expression rekombinanter Proteine, deren Gene unter der Kontrolle eines T7-Promotors und *lacO*-Operators stehen. Da in das *int*-Gen von DE3 das Gen für die T7-RNA-Polymerase sowie das für den Lactoserepres-

sor kodierende Gen *lacI* inseriert sind, kann der Prophage das Bakterienchromosom nicht ohne Helferphagen verlassen. Das Gen für die T7-RNA-Polymerase steht unter der Kontrolle des *lacUV5*-Promotors und des *lacO*-Operators, so dass die Expression der T7-RNA-Polymerase durch Zugabe von Isopropyl-1-thio- β -D-galaktopyranosid (IPTG) induzierbar ist. Diese transkribiert dann ausschließlich unter T7-Promotor und *lacO*-Operator stehende Gene.

Die Thioredoxin-Reduktase-Defizienz von AD494- und Origami-Stämmen wird über eine Kanamycin-Resistenz selektiert; Origami-Stämme sind zusätzlich gegen Tetracyclin resistent. Beide Stämme sind Leucin-auxotroph, so dass bei Kultivierung mit Minimalmedium zusätzlich L-Leucin (40 μ g/ml) zugegeben werden muss.

3.2 Plasmide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide besitzen zur Selektion eine Ampicillin-Resistenz und sind in Tab. 3.2 aufgeführt.

Tab. 3.2: Übersicht über Bezeichnung, Eigenschaft und Referenz der verwendeten Plasmide

Plasmid	Eigenschaft	Referenz/Quelle
pBlueskript II KS (Phagemid)	Klonierungsvektor	Stratagene, La Jolla, USA
pBlueskript II KS-EK- <i>dom15</i>	pBlueskript II KS-Derivat mit Gen für Enterokinaseerkennungsssequenz vor LEKTI-Domäne 15 (D989-E1064) in MCS	diese Arbeit
pBlueskript II KS-PreS- <i>dom15</i>	pBlueskript II KS-Derivat mit Gen für PreScission-Proteaseerkennungsssequenz vor LEKTI-Domäne 15 (D989-E1064) in MCS	diese Arbeit
pBlueskript II KS-PreS- <i>dom15kurz</i>	pBlueskript II KS-Derivat mit Gen für PreScission-Proteaseerkennungsssequenz vor COOH-terminal verkürzter LEKTI-Domäne 15 (D989-E1047) in MCS	diese Arbeit
pBlueskript II KS-PreS- <i>dom15ldti</i>	pBlueskript II KS-Derivat mit Gen für PreScission-Proteaseerkennungsssequenz vor LDTI-Variante von <i>dom15kurz</i> (Substitution von K994-L1005 durch A) in MCS	diese Arbeit
pET-21a-HisVak15	pET-21a-Derivat, mit Gen für LEKTI-Domäne 15 (D989-E1064) in MCS	Dr. P. Kreutzmann, IPF PharmaCeuticals, Hannover
pET-32a	Expressionsvektor mit T7-Promotor, <i>lacO</i> -Operator und DNA-Sequenzen für einen NH ₂ -terminalen Thioredoxin- (<i>trx</i>) und Hexa-Histidin- (His ₆ - <i>tag</i>) Anhang, sowie eine Thrombin- und Enterokinase-Spaltstelle	Novagen, Madison, USA
pET-32a-EK- <i>dom15</i>	pET-32a-Derivat mit Gen für Enterokinaseerkennungsssequenz vor LEKTI-Domäne 15 (D989-E1064) in MCS	diese Arbeit

Plasmid	Eigenschaft	Referenz/Quelle
pET-32a-PreS- <i>dom15</i>	pET-32a-Derivat mit Gen für PreScission-Protease-erkennungssequenz vor LEKTI-Domäne 15 (D989-E1064) in MCS	diese Arbeit
pET-32a-PreS- <i>dom15kurz</i>	pET-32a-Derivat mit Gen für PreScission-Protease-erkennungssequenz vor COOH-terminal verkürzter LEKTI-Domäne 15 (D989-E1047) in MCS	diese Arbeit
pET-32a-PreS- <i>dom15ldti</i>	pET-32a-Derivat mit Gen für PreScission-Protease-erkennungssequenz vor LDTI-Variante von <i>dom15kurz</i> (Substitution von K994-L1005 durch A) in MCS	diese Arbeit

MCS: erweiterte Klonierungsstelle (*multiple cloning site*)

pBlueskript II KS

Der Phagemid-Vektor pBlueskript II KS wurde zur Gewinnung ausreichender Mengen Plasmid-DNA für Sequenzierungen verwendet. Außerdem erlaubte er in Kombination mit Bakterienstämmen mit geeignetem Marker ($\Phi 80lacZ\Delta M15$), wie beispielsweise *E. coli* Top10 (Kap. 3.1), bei Kultivierung auf 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid- (X-Gal-) / IPTG-haltigem Medium (Kap. 3.7.2) die Identifizierung positiver Transformanten über α -Komplementation (Blau-Weiß-Screening), da die erweiterte Klonierungsstelle (*multiple cloning site*, MCS) im β -Galaktosidase-Gen (*lacZ*) liegt (Abb. 3.1; Sambrook *et al.*, 1989). Die Insertion der jeweiligen Sequenzen erfolgte über die *Xba*I- und *Bam* HI-Schnittstelle.

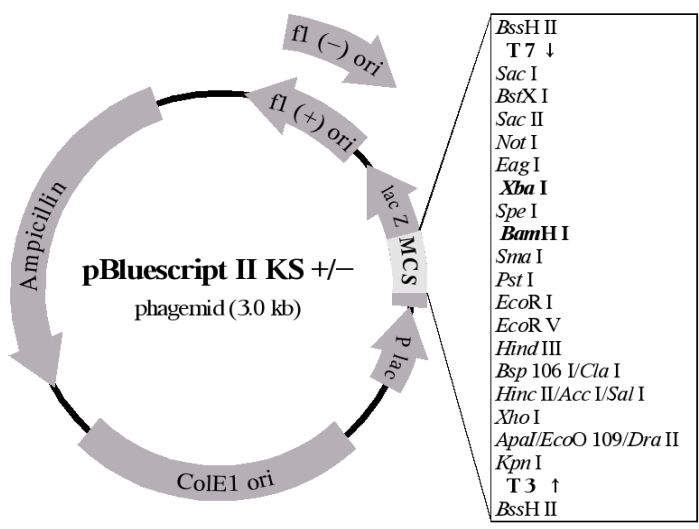


Abb. 3.1: Schematische Darstellung des Phagemid-Vektors pBlueskript II KS

Ampicillin: Gen für Ampicillin-Resistenz (Selektionsmarker); ColE1 ori: Plasmid-Replikationsursprung; f1 (+) ori: Replikationsursprung des Bakteriophagen f1 zur Produktion einzelsträngiger DNA; lacZ: Gen für β -Galaktosidase; P lac: *lac* Promotor; MCS (*multiple cloning site*) von *Sac* I bis *Kpn* I, mit zahlreichen verschiedenen singulären Restriktionsschnittstellen, von denen *Xba*I und *Bam* HI zur Insertion genutzt wurden; T3 und T7: RNA-Polymerase Promotor-Region (nach Stratagene Katalog).

pET-32a

Der Vektor pET-32a dient der induzierbaren Überexpression von Genen als Fusionsprotein mit *E. coli*-Thioredoxin (*trx*A) und Hexa-Histidin-Sequenz (*His*₆-tag) (Novy *et al.*, 1995) und

wurde zur Gewinnung der verschiedenen Varianten der LEKTI-Domäne 15 eingesetzt. Erfolgt die Expression von Thioredoxin-Fusionsproteinen in Thioredoxin-Reduktase negativen (*trxB*⁻) *E. coli*-Stämmen, können viele in *E. coli* normalerweise als unlösliche Aggregate (*inclusion bodies*) gebildete heterologe disulfidverbrückte Proteine in löslicher, biologisch aktiver Form erhalten werden (LaVallie *et al.*, 1993). In oxidativem Cytoplasma wirkt Thioredoxin offenbar entgegen seiner eigentlichen *in vivo*-Funktion katalysierend auf die Ausbildung von Disulfidbrücken (Stewart *et al.*, 1998).

Dem Thioredoxin folgt eine Hexa-Histidin-Sequenz (*His₆-tag*) mit anschließender Proteinase-Schnittstelle vor dem eigentlichen Zielprotein. Der *His₆-tag* ermöglicht eine Reinigung des Fusionsproteins nach Zellaufschluss sowie die Abtrennung des Thioredoxin/Histidin-Anhangs (*Trx-tag*) vom Zielprotein nach Proteinase-Spaltung über immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (Porath, 1992; Kap. 3.7.5.2). Die Expression des Fusionsproteins ist durch IPTG-Zugabe induzierbar, da das *trxA*-Gen unter der Kontrolle des T7-Promotors und des *lacUV5*-Operators steht (Kap. 3.1; 3.2). Für die Insertion der Erkennungssequenz der Proteinasen (Enterokinase bzw. PreScission-Protease) und LEKTI-Domäne 15-Varianten kodierenden Sequenzen wurde die *KpnI*-/Bam HI-Schnittstelle der MCS genutzt. Abb. 3.2 gibt die Plasmidkarte von pET-32a mit einem Ausschnitt der T7-Transkriptions- bzw. Expressionsregion und MCS wieder.

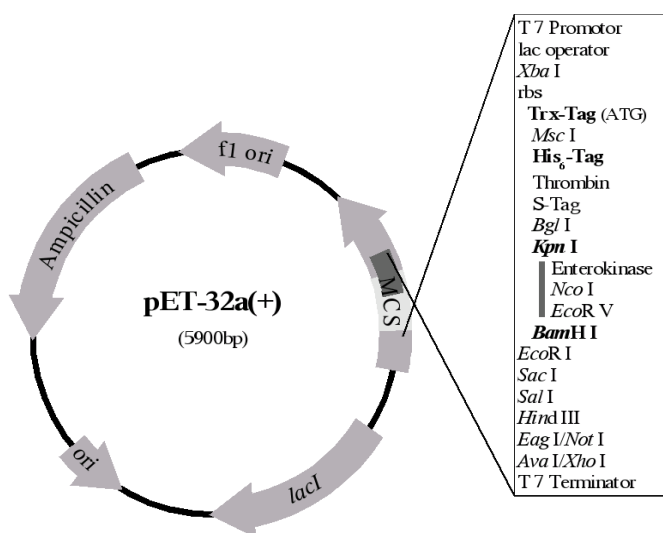


Abb. 3.2: Schematische Darstellung des Expression-Vektors pET-32a

Ampicillin: Gen für Ampicillin-Resistenz (Selektionsmarker); ori: (pBR322 origin) Plasmid-Replikationsursprung; f1 ori: Replikationsursprung des Bakteriophagen f1 zur Produktion einzelsträngiger DNA; *lacI*: Gen für den *lacI*-Repressor; MCS (*multiple cloning site*) von *Nco I* bis *Xho I*, mit zahlreichen verschiedenen singulären Restriktionsschnittstellen; rbs: ribosomale Bindungsstelle; Trx-Tag: Beginn der Transkription (Startcodon ATG); das Gen für die zu exprimierende LEKTI-Domäne 15-Variante (I) wurde jeweils über *KpnI*-/Bam HI-Schnittstelle inseriert (nach Novagen Katalog).

pET-21a-HisVak15

Das Vektorkonstrukt pET-21a-HisVak15, das von Dr. Peter Kreutzmann (IPF PharmaCeuticals, Hannover) zur Verfügung gestellt wurde, enthielt das Gen für den in dieser Arbeit als Domäne 15 (dom15) bezeichneten und sich von D989 bis E1064 erstreckenden Sequenzbe-

reich des LEKTI-Vorläufer-Proteins aus *Homo sapiens* (Swiss-Prot-Datenbank: Q9NQ38; Boeckmann *et al.*, 2003; TrEMBL-Datenbank: AJ228139; Apweiler *et al.*, 2004).

3.3 Oligodesoxyribonukleotide

Die in dieser Arbeit eingesetzten Oligodesoxyribonukleotide sind in Tab. 3.3 aufgeführt und wurden von der Firma BioTez (Berlin) und MWG-Biotech (Ebersberg) bezogen.

Tab. 3.3: Übersicht über Bezeichnung, Nukleotidsequenz und Länge der verwendeten Oligonukleotide

Bezeichnung	Nukleotidsequenz	Länge
<i>dom15_3'</i>	5'-GGA GGA GGA TCC TTA TTC GTC AGA CGG GGG CAT GCT GGC TGC-3'	42mer
<i>dom15kurz_C_3'</i>	5'-GGA GGA GGA TCC TTA TTA CTC ACA CTT CCC TGT ACT GCG GAT GTG -3'	45mer
<i>dom15LDTI_5'</i>	5'-GGA GGA TCTAGA GGT ACC CTG GAA GTT CTG TTC CAG GGG CCC GAT TCT GAG ATG TGC GCG TGT CCA AAG GAT TTA AAG CCT GTC TGT-3'	87mer
<i>EK_dom15_5'</i>	5'-GGA GGA TCT AGA GGT ACC GAC GAC GAC GAC AAG GAT TCT GAG ATG TGC AAA GAC TAC CGA GTA-3'	63mer
<i>PreS_dom15_5'</i>	5'-GGA GGA TCT AGA GGT ACC CTG GAA GTT CTG TTC CAG GGG CCC GAT TCT GAG ATG TGC AAA GAC TAC CGA GTA-3'	72mer
<i>T7-Terminator</i>	5'-GGG GTT ATG CTA GTT ATT GG-3'	20mer
<i>trx-forward</i>	5'-CGA GGA ACT CTT TCA ACT GAC C-3'	22mer

3.4 Enzyme, Standards und Chemikalien

Nachstehend sind die Bezugsquellen der in dieser Arbeit verwendeten Enzyme, Standards und Chemikalien aufgeführt. Alle anderen hier nicht aufgeführten (Standard-) Chemikalien wurden in den Reinheitsgraden *pro analysis* (p.a.) bzw. *reinst* von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Sigma (München) und Serva (Heidelberg) bezogen:

- Amersham Biosciences (Freiburg): PreScission™-Protease
- Bio-Rad (München): Proteinstandard (*low range*; Phosphorylase B: 97,4 kDa; Rinderse-
rumalbumin: 66,2 kDa; Ovalbumin: 45,0 kDa; Carboanhydrase: 31,0 kDa; Trypsininhibi-
tor: 21,5 kDa; Lysozym: 14,4 kDa)
- Cambridge Isotope Laboratories (Andover, USA): ¹⁵N-Ammoniumchlorid
- CAMPRO (Veenendaal, Niederlande): ¹⁵N-L-Leucin (>98 % ¹⁵N)
- Fluka (Neu-Ulm): Agar; Coomassie® Brilliant Blau; β-Mercaptoethanol; Ethidiumbromid;
Tetracyclin-Hydrochlorid; Trifluoressigsäure (TFA); Vitamin B₁-Hydrochlorid; N,N-Di-
methylformamid; Proteinstandard (Bromcyan-Spaltungsfragmente aus Pferdeherzmyoglo-
bin: 17,0; 14,5; 10,7; 8,2; 6,3; 2,5 kDa); Trypsin, behandelt mit N-Tosyl-L-Phenylalanin-
Chlormethyl-Keton (TPCK), aus Rindermagen (7611 U/mg)

- GERBU (Gaiberg): Isopropyl-1-thio- β -D-galaktopyranosid (IPTG); Ampicillin; Kanamycinsulfat
- GibcoBRL (Eggenstein): T4-DNA-Ligase (hc)
- Isotec Inc. (Matheson, USA): D₂O (99,996 Atom% D)
- MBI Fermentas (Vilna, Litauen): *Bam* HI; *Xba*I; *Kpn*I und *Taq*-DNA-Polymerase; pUC19/*Msp*I-Standard (Fragmentgrößen: 501, 489, 242, 190, 147, 111, 110, 67, 34, 26 bp); Bakteriophagen λ -DNA; *Hind*III; Desoxyribonukleotide (dNTPs); Y+/Tango™ Puffer; CIAP (*calf intestine alkaline phosphatase*)
- New England Biolabs (Schwalbach, Taunus): *Vent*-DNA-Polymerase
- Novagen (Madison, USA): rekombinante Enterokinase
- Roche (Mannheim): Protease-Inhibitor-Cocktail Tablette Complete EDTA-free (EDTA = Ethylendiamintetraacetat)
- Roth (Karlsruhe): Acrylamidfertiglösungen; Agarose; Imidazol; 2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure (MES); Pepton; Hefeextrakt; 4 \times Roti-Load® Probenpuffer; Natriumdodecylsulfat (SDS); 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal)
- Serva (Heidelberg): L-Leucin; N-,N-,N',N'-Tetramethylenethylendiamin (TEMED)
- Sigma-Aldrich (München): Benzamidin; Adenosintriphosphat (ATP); N- α -Benzoyl-D,L-arginin-p-nitroanilid (D,L-BAPNA); Lysozym; Rinderserumalbumin BSA (2 mg/ml); D₂O (99,9 Atom% D)

3.5 Sonstige Materialien und Geräte

Zusätzlich zu den Geräten und Materialien, die nicht bei den jeweiligen Methoden aufgeführt sind, wurden verwendet:

- Autoklav 23 (Melag, Berlin)
- Blockthermostat BT100 (Kleinfeld Labortechnik, Gehrden)
- C25KC Incubator Shaker (New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA)
- Cellulose-Acetat-Filter, 0,45 μ M Porengröße, (Sartorius, Göttingen)
- Inkubatorschüttler Certomat HK/R (B. Braun Biotech International, Melsungen)
- Sicherheitswerkbank Heraeus HERAsafe HS (Kendro, Hanau)
- SpeedVac Vacuubrand (ABM Graffenberger Antriebstechnik, Marktredwitz)
- Tischkühlzentrifuge Biofuge fresco (bis 2,0 ml Probenvolumina, max. 13000 rpm) und Biofuge stratos (bis 30 ml Probenvolumina, max. 15000 rpm; Heraeus, Hanau)
- Varioklav Dampfsterilisator (H+P Labortechnik, Oberschleißheim)
- Waage MC1 und Feinwaage AC 1215 (Sartorius, Göttingen)
- WTW pH 535 MultiCal mit pH-Meter WTW inoLab (WTW, Weilheim)

Das Erstellen von Restriktionskarten, die Berechnung des Molekulargewichtes von Proteinfragmenten und Fusionsproteinen sowie die Analyse von DNA- oder Proteinsequenzen erfolgte mit Programmen des Wisconsin Packages (Genetic Computer Group Inc., GCG, Version 1998, Madison, USA).

3.6 Molekularbiologische Arbeitsmethoden

3.6.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurde der NucleoSpin®-Kit von Macherey-Nagel (Düren) verwendet. Hier wird die alkalische Lyse von Bakterienzellen und anschließende Fällung von DNA und Proteinen mit Anionenaustauschchromatographie kombiniert. Die Durchführung erfolgte nach Anweisungen des Herstellers (Plasmid DNA Purification, Macherey-Nagel, Düren). Die getrocknete Plasmid-DNA wurde in 50 µl sterilem *aqua bidest.* aufgenommen. Nach Kontrolle der Reinheit durch Agarosegelelektrophorese (Kap. 3.11.1) wurde diese Plasmid-DNA für Restriktionsreaktionen (Kap. 3.6.3), zur Sequenzierung (Kap. 3.6.5) und für Transformationen (Kap. 3.7.1) eingesetzt.

3.6.2 Fällung und Reinigung von DNA

Butanolpräzipitation

Zur Präzipitation von DNA aus Ligationsansätzen wurde n-Butanol verwendet (Thomas, 1994). Hierzu wurde dem jeweiligen Ansatz das zehnfache Volumen n-Butanol zugegeben und bis zur Aufhebung der Phasentrennung geschüttelt. Die DNA wurde durch Zentrifugation (20 min, $10000 \times g$, 4 °C) präzipitiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und das Pellet nach vollständigem Trocknen in 10 µl sterilem *aqua bidest.* aufgenommen. Die gelöste DNA konnte direkt für eine Elektrotransformation eingesetzt werden (Kap. 3.7.1).

Reinigung von DNA über Silikagelmembranen

Zum Entsalzen der DNA und Abtrennen eingesetzter DNA-modifizierender Enzyme wurden Säulen mit Silikagelmembran (*QIAquick spin columns*, QIAquick Nucleotide Removal Kit, QIAGEN, Hilden) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben (*QIAquick Spin Handbook*, QIAGEN, Hilden). Die an die Silikagelmembran gebundene DNA wurde, wenn nicht anders erwähnt, mit 50 µl sterilem Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 8,5) eluiert.

Reinigung und Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach Abtrennung unerwünschter DNA-Spezies nach PCR oder Restriktionsreaktionen mittels nativer Agarosegelelektrophorese (Kap. 3.11.1) wurden gewünschte DNA-Fragmente mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraction Kit* (bis 10 µg DNA; QIAGEN, Hilden) zurückgewonnen. Die Reinigung erfolgte nach Herstellerangaben (*QIAquick Spin Handbook*, QIAGEN, Hilden), wobei die DNA mit 50 µl sterilem Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 8,5) eluiert wurde. Die Reinheit wurde per Agarosegelelektrophorese (Kap. 3.11.1) kontrolliert.

3.6.3 Modifikation von DNA

Restriktion

Für den Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen vom Typ II wurde die jeweilige DNA-Lösung (0,1 - 0,5 µg DNA/µl) mit den vom Hersteller empfohlenen Mengen Puffer und Enzym (1 - 5 U je µg DNA) versetzt. Für eine vollständige Restriktion wurden die Ansätze mindestens 3 h bei 37 °C im Brutschrank (Modell BE 200, Memmert, Schwabach) inkubiert, falls vom Hersteller nicht anders vorgegeben. Eine gleichzeitige Restriktion der DNA mit unterschiedlichen Enzymen war möglich, falls diese bei gleichen Pufferbedingungen aktiv waren. Anderfalls erfolgte der Verdau nacheinander, wobei die DNA zusätzlich nach dem ersten Inkubationsschritt über Silikagelmembranen gereinigt wurde (Kap. 3.6.2). Eine Agarosegelelektrophorese (Kap. 3.11.1) diente zur Kontrolle.

Dephosphorylierung von 5'-Enden

Die Dephosphorylierung von restringierter Vektor-DNA vermindert die Religationsrate, weshalb die 5'-überhängenden Phosphatgruppen durch Zugabe von 1 U alkalischer Phosphatase (*calf intestine alkaline phosphatase* (CIAP), MBI Fermentas, Vilna, Litauen) pro µg DNA in Dephosphorylierungspuffer (10 mM Tris/HCl, 10 mM MgCl₂, pH 7,5) abgespalten wurden. Nach Inkubation für 30 min bei 37 °C und weiteren 30 min bei 56 °C wurde nochmals 1 U CIAP pro µg DNA zugegeben und die beiden Inkubationsschritte wiederholt. Enzym und Puffer wurden vor weiteren enzymatischen Schritten mittels *QIAquick*-spin-Säulen (Kap. 3.6.2) abgetrennt.

Ligation

Zur Ligation von DNA-Fragmenten mit überhängenden Enden wurden 50 - 100 ng doppelt restringierte, dephosphorylierte Vektor-DNA und das doppelt verdaute Insert in einem molaren Verhältnis von etwa 1 : 2 in T4-DNA-Ligase-Puffer (50 mM Tris/HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 10 mM DTT, 5 % (w/v) PEG 8000, pH 7,6) für mindestens 3 h mit 1 U T4-DNA-Ligase (Invitrogen, Groningen, Niederlande) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Hitze-Inaktivierung der Ligase (10 min, 65 °C) wurde die ligierte DNA durch Butanolfällung (Kap. 3.6.2) präzipitiert und zur Transformation (Kap. 3.7.1) eingesetzt.

3.6.4 Anwendungen der Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) erlaubt eine schnelle selektive, enzymatische Amplifikation von DNA-Fragmenten *in vitro* (Saiki *et al.*, 1985). Diese Methode wurde in dieser Arbeit zur Anreicherung von Insert-DNA, zur Mutagenese von DNA-Fragmenten und zur Iden-

tifizierung positiver Transformanten nach Klonierungsexperimenten eingesetzt und wurde mit den Geräten GeneAmp PCR System 2400 bzw. GeneAmp PCR System 9600 von Perkin Elmer (Norwalk, USA) durchgeführt.

PCR mit Linker-Primern

Um die flankierenden Bereiche von DNA-Fragmenten zu verändern, wurde eine PCR mit Linker-Primern durchgeführt. Neben den Sequenzen für die gewünschte Restriktions- und Proteinaseschnittstellen im 5'-Bereich wiesen die Primer einen zur Matrize komplementären 3'-Bereich von mindestens 21 Nukleotiden auf, um eine stringente Hybridisierung zu gewährleisten.

In einem PCR-Reaktionsgefäß wurden 50 - 100 ng Plasmid-DNA, je 1 μM der beiden Primer, 200 μM jeden dNTPs (in 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 20 mM Tris/HCl, pH 8,8, 10 mM KCl, 0,1 % Triton X-100 und 2 mM MgSO_4) in einem Volumen von 100 μl vorgelegt. Nach Zugabe von 2 U *Vent*-DNA-Polymerase (New England Biolabs, Schwalbach/Taunus) wurde der Ansatz bei 95 °C für 5 min denaturiert. Wenn nicht anders erwähnt wurden je 30 - 35 Zyklen mit 30 s Denaturierung bei 95 °C, 20 s Primer-Hybridisierung bei 50 °C und Primer-Verlängerung bei 72 °C über einen Zeitraum von 6 - 10 s pro 100 bp durchgeführt. Zur Vervollständigung der Amplifikation wurde der letzte Primer-Extensions-Schritt um 2 min verlängert. Anschließend wurde der gesamte Reaktionsansatz mit Hilfe eines präparativen Agarosegels aufgetrennt und das amplifizierte DNA-Fragment durch Gelextraktion (Kap. 3.6.2) gewonnen.

Kolonie-PCR

Mit Hilfe der Kolonie-PCR konnten Transformanten ohne vorherige Plasmidisolierung auf eine erfolgreiche Klonierung hin getestet werden. Bakterienkolonien dienten dabei als Quelle für die Matrizen-DNA. Als Primer wurden Oligonukleotide eingesetzt, die stromaufwärts bzw. -abwärts des klonierten Fragments hybridisieren, bzw. zu den 5'- und 3'-Enden des inserierten DNA-Fragments komplementär sind.

So wurden in einem PCR-Reaktionsgefäß jeweils 1 μM der beiden Primer, 200 μM jeden dNTPs in 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 4 mM MgCl_2 , 10 mM Tris/HCl, pH 8,8, 50 mM NaCl, 0,08 % Nonidet P-40 (Octylphenolpoly(ethylenglycolether)), 0,2 mg BSA pro ml vorgelegt. Anschließend wurde 0,5 U *Taq*-DNA-Polymerase (MBI Fermentas, Vilna, Litauen) pro 50 μl Ansatz auf Eis zugegeben. Mit einem sterilen Zahnstocher wurde vorsichtig eine gut separierte Bakterienkolonie von der Agarplatte abgenommen und in den PCR-Ansatz eingetaucht. Anschließend wurde der Zahnstocher in 10 ml steriles LB-Selektivmedium (Kap. 3.7.2) in

Glas-Kulturröhrchen mit Kapsenberg-Kappen überführt und bei 37 °C inkubiert.

Der PCR-Ansatz wurde für 5 min bei 95 °C denaturiert. Es folgten 35 Zyklen mit je 30 s Denaturierung bei 95 °C, 20 s Primer-Hybridisierung bei 50 °C und 40 s Primer-Verlängerung bei 72 °C. Der letzte Primer-Extension-Schritt wurde um 2 min verlängert und danach wurde auf 4 °C abgekühlt. Jeder Ansatz wurde mittels Agarosegelelektrophorese (Kap. 3.11.1) analysiert. Die Flüssigkulturen der Kolonien, für die ein DNA-Fragment in der Größe des zu amplifizierenden Bereichs festgestellt wurde, wurden weiter bei 37 °C inkubiert und zur Herstellung von Dauerkulturen (Kap. 3.7.2) sowie für eine Plasmidisolierung (Kap. 3.6.1) verwendet.

3.6.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur näherungsweisen Bestimmung von DNA-Konzentrationen wurde die Absorption der jeweiligen Lösung bei 260 nm (A_{260}) mit einem Uvikon 930 Zweistrahl-Spektralphotometer (Kontron, Eching) oder mit einem Einstrahlphotometer (Helios γ Spektrophotometer, Thermo Spectronic, Cambridge, UK) ermittelt, wobei UV-Einmal-Plastikküvetten (Brand, Wertheim) mit einer Schichtdicke von 1 cm sowie Schwarzwand-Quarzküvetten (Hellma, Mühlheim) mit 0,5 cm oder 1 cm Schichtdicke verwendet wurden. Dabei wurde zu Grunde gelegt, dass eine Absorptionseinheit bei 260 nm ($A_{260} = 1,0$) einer dsDNA-Menge von 50 μ g bzw. einer ssDNA-Menge von 33 μ g entspricht (Sambrook *et al.*, 1989).

3.6.6 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde von der Firma TOPLAB/MediGenomix (Martinsried) oder AGOWA (Berlin) durch Cycle-Sequenzierung mit fluoreszenzmarkierten ddNTPs als Kettenterminatoren auf einem ABI-System durchgeführt.

3.7 Mikrobiologische und präparative Arbeitsmethoden

3.7.1 Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA

Zur Übertragung von Plasmid-DNA in Bakterienzellen wurde sowohl die CaCl_2 -Methode (Cohen *et al.*, 1972) als auch die Elektroporation (Dower *et al.*, 1988) eingesetzt. War eine hohe Transformationseffizienz nötig, wie z.B. bei der Übertragung von DNA aus Ligationsansätzen, wurden die Bakterienzellen einer Elektrotransformation (Elektroporation) unterzogen.

CaCl_2 -Transformation

Zur Herstellung normalkompetenter Zellen wurde 50 ml LB-Medium (Kap. 3.7.2) mit einer Übernachtskultur (ÜNK) auf eine optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) von 0,1 inokuliert und

bei 37 °C unter Schütteln (200 rpm, Certomat HK/R, Braun, Melsungen) inkubiert. Bei einer OD_{600} von 0,6 bis 0,8 wurden die Zellen durch Zentrifugation ($4000 \times g$, 10 min, 4 °C) pelletiert, in 20 ml steriler, eiskalter $CaCl_2$ -Lösung (50 mM $CaCl_2$, 10 mM $RbCl$, 15 % (v/v) Glycerin, 10 mM Tris/HCl, pH 8,0) resuspendiert und erneut zentrifugiert. Danach wurden die Zellen in 10 ml $CaCl_2$ -Lösung aufgenommen und mindestens eine Stunde auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Zellpellet in 2 ml steriler, eiskalter $CaCl_2$ -Lösung resuspendiert und in 50 µl-Aliquots aufgeteilt. Die Zellen wurden bei –80 °C gelagert oder direkt für die Transformation (modifiziert, nach Hanahan, 1983) eingesetzt.

Hierzu wurden zu 50 µl normalkompetente Zellen 50 - 100 ng Plasmid-DNA (in 3 - 5 µl Wasser gelöst) gegeben und der Ansatz 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem 90 s dauernden Hitzeschock bei 42 °C und weiterer Inkubation für 10 min auf Eis wurde 1 ml steriles LB-Medium (Kap. 3.7.2) zugegeben, der Ansatz für eine Stunde bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt (Certomat HK/R, Braun, Melsungen) und schließlich 200 µl der transformierten Zellen sowie ein Konzentrat aus den restlichen pelletierten Zellen (60 s, $10000 \times g$, 4 °C) direkt auf LB-Selektivmedium ausplattiert. Die Platten wurden bei 37 °C im Brutschrank (Modell BE 200, Memmert, Schwabach) inkubiert.

Elektrotransformation (Elektroporation)

Für die Herstellung elektrokompenter Zellen wurde 1 l LB-Medium (Kap. 3.7.2) mit einer ÜNK auf eine OD_{600} von 0,1 angeimpft und bei 37 °C geschüttelt (200 rpm). Bei einer OD_{600} von 0,5 bis 0,7 wurden die Zellen in vorgekühlten Zentrifugenbechern ($4000 \times g$, 15 min, 4 °C) geerntet und im weiteren Verlauf immer auf Eis gehalten. Nach Resuspendierung des Zellpellets in zunächst 1 l Glycerinlösung (10 % (v/v) Glycerin) wurden die Zellen erneut abzentrifugiert und der gleiche Schritt mit 500 ml und 250 ml Glycerinlösung wiederholt. Schließlich wurde das Zellpellet in 3 ml Glycerinlösung resuspendiert (ca. 1×10^{10} Zellen/ml) und in 60 µl-Portionen aufgeteilt. Die Zellen wurden direkt für eine Elektroporation eingesetzt oder bei –80 °C aufbewahrt.

Für die Elektrotransformation wurden etwa 5 - 10 ng Plasmid-DNA in 3 µl Wasser in vorgekühlten Elektroporationsküvetten (0,1 cm, BioRad, München) vorgelegt, mit 60 µl elektrokompenten Zellen gemischt und 2 min auf Eis inkubiert. Die Küvette wurde in den vorgekühlten Schlitten des Elektroporators (MicroPulser™, BioRad, München) eingesetzt und in die Schockkammer eingeführt. Der Puls erfolgte mit 1,8 kV. Die Bakteriensuspension wurde dann sofort mit 1 ml sterilem LB-Medium vermischt, in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt

und für 90 min bei 37 °C unter Schütteln (200 rpm) inkubiert. Danach wurden die Zellen, wie bei der CaCl₂-Transformation (Kap. 3.7.1) beschrieben, auf Platten mit Selektivmedium transferiert und bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

3.7.2 Anzucht von Bakterien

Kulturmedien

Alle Medien wurden mit *aqua bidest.* hergestellt und zur Sterilisation autoklaviert (20 min, 1,2 bar, 121 °C; Autoklav Typ 23 bzw. Varioklav, Melag, Berlin). Selektivmedien wurden durch Zugabe von sterilfiltriertem (Minisart, 0,2 µm Filter, Sartorius, Göttingen) Antibiotikum (Endkonzentrationen: Ampicillin 100 µg/ml; Kanamycin 15 µg/ml; Tetracyclin 12,5 µg/ml) zu den sterilisierten, auf etwa 50 °C abgekühlten Medien erhalten.

LB-(Luria Bertani)-Flüssigmedium

10 g Pepton (tryptisch verdaut), 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, *ad* 1000 ml *aqua bidest.*

Agarplatten

LB-Medium wurde mit 1,5 % (w/v) Agar versetzt und 20 min bei 121 °C und 1,1 bar autoklaviert (Varioklav, Melag, Berlin). Die entsprechenden Antibiotika wurden nach Abkühlen auf ca. 80 °C zugesetzt und Petrischalen (92 × 16 mm) mit je 10 ml befüllt.

Dem Medium für Agarplatten für Blau-Weiß-Screening (Kap. 3.2) waren außerdem IPTG und 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid (X-Gal) in den Konzentrationen 210 µM (IPTG) bzw. 100 µM (X-Gal) zugesetzt worden.

Minimalflüssigmedium

Grundlage für Minimalmedien bildete M9-Minimalmedium (Sambrook *et al.*, 1989), dem TS2 Spurenelementlösung (Meyer & Schlegel, 1983) und Vitamin B₁-Hydrochlorid (Merck, Darmstadt) zugefügt wurde.

Für je 1 l Minimalmedium wurden 200 ml 5-fach M9-Stammlösung mit 800 ml *aqua bidest.* versetzt und autoklaviert. Anschließend wurden folgende autoklavierten bzw. sterilfiltrierten (Minisart, 0,2 µm Filter, Sartorius, Göttingen) Lösungen zugegeben: 2,0 ml 1M MgSO₄, 2,0 ml TS2-Lösung, 1,0 ml 10 mM Fe(III)citrat, 20 ml 20 % (w/v) Glucose, 100 µl 1M CaCl₂, 100 µl 0,5 % (w/v) Vitamin B₁, 1,0 ml (40 mg/ml) L-Leucin bzw. ¹⁵N L-Leucin.

5-fach M9-Stammlösung: 85,5 g Na₂HPO₄·12 H₂O, 15,0 g KH₂PO₄, 2,5 g NaCl, 5,0 g NH₄Cl, bzw. ¹⁵NH₄Cl, *ad* 1000 ml *aqua bidest.*

Spurenelementlösung TS2: 100 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 30 mg $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, 300 mg H_3BO_3 , 20 mg Na_2SeO_3 , 200 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 20 mg $\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 10 mg $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 900 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, *ad* 1000 ml *aqua bidest*.

Übernachtkulturen

5 bis 20 ml LB- bzw. M9-Medium mit den erforderlichen Antibiotika (Ampicillin: 100 µg/ml; bei *E. coli* AD494(DE3) und Origami(DE3): Kanamycin: 15 µg/ml; zusätzlich bei *E. coli* Origami(DE3): Tetracyclin: 12,5 µg/ml) wurden entweder mit einer gut separierten Bakterienkolonie oder mit 50 µl (bei LB-Medium) bzw. 300 µl (bei M9-Medium) einer Dauerkultur inokuliert. Die Kultur wurde über Nacht bei 37 °C und unter Schütteln (200 rpm) inkubiert.

Herstellung von Dauerkulturen

Dauerkulturen wurden durch Mischen von 850 µl einer ÜNK mit 150 µl sterilem Glycerin (87 % (v/v)) hergestellt. Die Kulturen wurden bei –80 °C aufbewahrt.

Bestimmung der Bakteriendichte

Zur Bestimmung der Bakteriendichte in Nährlösungen wurde die optische Dichte der Suspension bei 600 nm (OD_{600}) mit einem Uvikon 930 Zweistrahl-Spektralphotometer (Kontron, Eching) und mit einem Einstrahlphotometer (Helios γ Spektrophotometer, Thermo Spectronic, Cambridge, UK) gemessen, wobei Polystyrol-Halbmikroküvetten (Roth, Karlsruhe; Sarstedt, Nümbrecht) verwendet wurden und das jeweilige Kulturmedium als Referenz diente. Eine Absorptionseinheit ($\text{OD}_{600} = 1,0$) entspricht etwa einer Bakteriendichte von 1×10^9 Zellen/ml. Bei OD_{600} -Werten größer als 0,5 wurde die für die Messung entnommene Bakterien-suspension entsprechend mit Nährlösung verdünnt.

3.7.3 Expression der Fusionsproteine

Induktionsversuche

Die Expressionsrate des gewünschten Genproduktes wurde bei den jeweiligen Bakterienstämmen mit positivem Transformationstest-Ergebnis (Kap. 3.6.4) bei einer IPTG-Konzentration von 1 mM sowohl in LB-Medium als auch in Minimalmedium (Kap. 3.7.2) überprüft. Mit dem Test auf Expression in Minimalmedium sollte festgestellt werden, ob eine Markierung des gewünschten Proteins mit dem NMR-aktiven Isotop ^{15}N möglich ist. Bei Stämmen mit guter Expression wurde zudem Temperatur und Induktionsdauer variiert, um die bestmöglichen Bedingungen zu finden.

So wurden 50 bis 100 ml LB- oder M9-Selektivmedium in 100, 200 bzw. 250 ml Erlenmeyer-

kolben mit Schikanen mit einer ÜNK des zu testenden Stammes auf eine OD_{600} von 0,1 (LB-Medium) bzw. 0,3 (M9-Medium) inokuliert und bei 37 °C unter Schütteln (200 rpm) inkubiert. Bei einer OD_{600} von etwa 0,8 (LB) bzw. 0,9 (M9) wurde mit IPTG (Endkonzentration: 1 mM) induziert und 3 bis 4 h (bzw. über Nacht) weiter inkubiert. Unmittelbar vor und stündlich nach Induktion wurde ein Aliquot Bakterienkultur entnommen, das einer OD_{600} von 1,0 entsprach und nach Zentrifugation (1 min, $10000 \times g$, 4 °C) zur Analyse der Expressionsrate mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Kap. 3.11.2) aufgetrennt wurde.

Zellkultivierung

Zur Gewinnung rekombinanter Proteine wurden Expressionsstämme in Erlenmeyerkolben mit Schikanen kultiviert, wobei die Kolben maximal zu zwei Dritteln befüllt wurden.

Als Vorkultur wurden 50 - 250 ml LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika direkt mit 50 - 200 µl einer Dauerkultur beimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Im Fall der Verwendung von Minimalmedium wurden zunächst 30 ml Selektivmedium mit einer kompletten Übertagkultur (10 ml) beimpft und über Nacht inkubiert (37 °C, 200 rpm). Anschließend wurden damit nacheinander 150 und 200 ml M9-Medium angeimpft und jeweils erneut über Tag bzw. Nacht inkubiert.

Bis zu 3×3 l des entsprechenden Mediums in 5 l Erlenmeyerkolben mit Schikanen wurden mit diesen Vorkulturen auf eine OD_{600} von 0,1 (LB) bzw. 0,3 (M9) inokuliert und bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Bei einer OD_{600} von 0,8 (LB) bzw. 0,9 (M9) wurde durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration: 1 mM) induziert und für 3 bis 4 h bei 37 °C kultiviert.

Wie in Kap. 3.7.3 beschrieben, wurden direkt vor und stündlich nach Induktion entnommene Aliquots mittels SDS-Gelelektrophorese (Kap. 3.11.2) analysiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (15 min, $5000 \times g$, 4 °C) in einer Kühlzentrifuge (Kühlzentrifuge Centrikon T-124 mit einem A 6.9 Rotor, Kontron, Eching) geerntet und das Nasszellgewicht bestimmt. Die Zellpellets wurden sofort aufgeschlossen (Kap. 3.7.4.1) oder bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.7.4 Reinigung der Fusionsproteine

3.7.4.1 Zellaufschluss

Die abzentrifugierten Zellen (Kap. 3.7.3) wurden in 4 - 8 ml Aufschlusspuffer pro Gramm Nasszellgewicht resuspendiert und 20 min auf Eis gerührt. Anschließend erfolgten unter Eiskühlung drei Ultraschallbehandlungen (200 Watt, Sonifier Labsonic U, Nadelsonde 40T; B. Braun, Melsungen) in einminütigem Abstand für jeweils 30 s. Die Lösung wurde weitere

10 min auf Eis gerührt und für mindestens 2 h bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ tiefgefroren. Nach dem Auftauen wurden die drei Ultraschallbehandlungen wiederholt und durch Ultrazentrifugation (45 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 40000 rpm, Centrikon T-1170, Rotor TFT70.38, Kontron, Eching) Membranen und Zelltrümmer sedimentiert.

Aufschlusspuffer: 50 mM Tris/HCl bzw. Natrium-Phosphat, pH 8,0, 300 mM NaCl, 0,2 mg/ml Lysozym, 0,2 mg/ml DNaseI, 2 mg/ml Benzamidin, 1 Proteinaseinhibitor-Cocktail-Tablette EDTA-frei pro 100 ml Puffer, in *aqua bidest.*

3.7.4.2 Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie

Zur Reinigung von Proteinen mit Histidin-*tag* kann die hohe Affinität der Imidazol-Seitenketten der Histidine zu über chelatierende Gruppen an die Säulenmatrix gebundene Metallionen, wie Ni^{2+} oder Co^{2+} , genutzt werden (Porath, 1992). Nachdem die gewünschten Zielproteine als Fusionsproteine mit Hexa-Histidin-Sequenz exprimiert wurden (Kap. 3.2.2), wurde eine ausreichend starke Bindung der Fusionsproteine an die an einer Sepharose-Matrix immobilisierten Co^{2+} -Ionen erwartet. Zelluläre Proteine ohne speziellen Affinitäts-*tag* hingegen sollten eine nur schwache Wechselwirkung mit dem Säulenmaterial zeigen und durch Waschen mit Bindungspuffer bzw. bei niedrigen Konzentrationen des Kompetitors Imidazol von der Säule verdrängt werden können. Die Fusionsproteine mit His₆-*tag* können dann mit hohen Imidazol-konzentration eluiert werden.

Gesteuert über ein ÄKTApurifier 10 FPLC-(*Fast Performance Liquid Chromatography*)-System (Amersham Biosciences, Freiburg) wurde eine mit 15 ml TALON™-Säulenmaterial (TALON™ Superflow Resin, Clontech, Heidelberg) beladene Säule mit dreifachem Bettvolumen ($3 \times \text{Vol}$) Bindungspuffer (50 mM Tris/HCl bzw. 50 mM Natrium-Phosphat, 300 mM NaCl, pH 8,0) äquilibriert, die gefilterte Probe (0,2 μm Filter, Sartorius, Göttingen) bei einer Flussrate von 1 ml/min aufgetragen und unspezifisch gebundene zelluläre Proteine durch Waschen mit $6 \times \text{Vol}$ Bindungspuffer verdrängt (Flussrate: 2 ml/min). Die Fusionsproteine wurden mittels Imidazol-Gradienten (jeweils bis zu $5 \times \text{Vol}$ 2, 4, und 10 % Anteil Elutionspuffer (1 M Imidazol in Bindungspuffer, pH 8,0) in bis zu 3 ml großen Fraktionen eluiert und proteinhaltiges Eluat mittels SDS-Gelelektrophorese (Kap. 3.11.2) analysiert. Zur Regeneration wurde die Säule mit $4 \times \text{Vol}$ reinem Elutionspuffer sowie mit $4 \times \text{Vol}$ MES-Puffer (20 mM MES, 100 mM NaCl, pH 5,0) und abschließend mit $6 \times \text{Vol}$ Wasser gewaschen.

3.7.5 Entfernen des Fusionsanhanges

3.7.5.1 Spaltung der Fusionsproteine mit Proteinasen

Nach der Reinigung der Fusionsproteine (Kap. 3.7.4.2) wurden die gewünschten Fraktionen vereinigt und gegen Spaltpuffer (für Enterokinase: 50 mM Tris/HCl, 50 mM NaCl, 2 mM CaCl_2 , pH 7,0; für PreScission-Protease (im weiteren Verlauf nur als PreScission bezeichnet): 50 mM Natrium-Phosphat, 150 mM NaCl, pH 8,0) dialysiert (Spectra/Por-Dialyseschlauch, 3500 Da Ausschlussgrenze, Roth, Karlsruhe).

Für die Spaltung mit Enterokinase wurde die dialysierte Proteinlösung mit der entsprechenden Menge CaCl_2 (Endkonzentration: 2 mM) versetzt und nach Herstellerangaben mit 1 U Enterokinase (Novagen, Madison, USA) pro 50 μg Fusionsprotein bei Raumtemperatur mindestens 16 h umgesetzt. Die Spaltung wurde durch Zugabe von PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid (Merck, Darmstadt); Endkonzentration: 1 mM) beendet. Die Spaltung mit PreScission erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers (Amersham Biosciences, Freiburg) mit 1 U PreScission pro 100 μg Fusionsprotein 15 h bei 4 °C. Auf eine Inaktivierung der Proteinase wurde verzichtet.

3.7.5.2 Trennung von Protein und Fusionsanhang

Die Trennung von Protein und Fusionsanhang erfolgte wie die Reinigung des Fusionsproteins mittels immobilisierter Co^{2+} -Ionen-Affinitätschromatographie unter Verwendung der gleichen Säule, Puffer und ÄKTA^{purifier}-Systemeinheit (Kap. 3.7.4.2). Hierzu wurde der Spaltansatz (Kap. 3.7.5.1) auf die mit Bindungspuffer äquilibrierte TALONTM-Säule aufgebracht (Flussrate: 1 ml/min) und mit 6 \times Vol Bindungspuffer gespült, bevor der Thio-redoxin/Histidin-Anhang sowie eventuell vorhandenes ungespaltenes Fusionsprotein mit einem Stufengradienten (jeweils bis zu 5 \times Vol 2, 4, 10 und 100 % Anteil Elutionspuffer) von der Säule verdrängt wurde (Flussrate: 2 ml/min). Proteinhaltigen Fraktionen wurden mittels SDS-Gelen nach Schägger und von Jagow elektrophoretisch (Kap. 3.11.2) analysiert. Nach Dialyse (Spectra/Por-Dialyseschlauch, 1000 Da Ausschlussgrenze, Roth, Karlsruhe) der gewünschten Fraktionen gegen *aqua bidest.* oder Ammoniumacetat-Puffer (20 mM, pH 6,4) wurde die Proteinlösung mit einer Christ Alpha 1-4 Gefriertrocknungsanlage (Christ, Osterode; Hochvakuumpumpe, Balzers Pfeiffer, Aßlar) lyophilisiert oder direkt für die weitere Reinigung eingesetzt (Kap. 3.11).

3.7.5.3 Größenausschlusschromatographie

Zur Entfernung von Verunreinigungen nach Abtrennung des Fusionsproteins (Kap. 3.7.5.2) unter nicht denaturierenden Bedingungen wurde eine Größenausschlusschromatographie (*size exclusion chromatography*, SEC) mittels einer Superdex™ 75 Hiload 26/60-Säule (Amersham Biosciences, Freiburg) durchgeführt. Nach Äquilibrieren der Säule (Bettvolumen: 296 ml) mit $2 \times \text{Vol}$ Ammoniumacetat-Puffer (20 mM, pH 6,4) wurden bis zu 1000 μl Probe bei einer Flussrate von 0,5 ml/min aufgetragen und mit weiteren $1,5 \times \text{Vol}$ Puffer bei gleicher Flussrate eluiert. Nach Analyse mittels Gelelektrophorese (Kap. 3.11.2) und Dialyse gegen *aqua bidest.* (Spectra/Por-Dialyseschlauch, 1000 Da Ausschlussgrenze, Roth, Karlsruhe) wurden die gewünschten Fraktionen wie beschrieben (Kap. 3.7.5.2) getrocknet. Das auf diese Weise unter nicht denaturierenden Bedingungen gewonnene Protein wurde für analytische Verfahren, Überprüfung der biologischen Aktivität (Kap. 3.14) oder für die NMR-Spektroskopie (Kap. 3.15) eingesetzt.

3.7.5.4 Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC)

Für die Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*reversed-phase*, RP) wurden die HPLC-Anlagen (*high performance liquid chromatography*) Kontron HPLC System (Kontron, Eching) und Waters Delta 600 System (Waters, Eschborn) eingesetzt.

Zur Auftrennung von Proteingemischen mittels RP-HPLC wurde die Proteinlösung filtriert (0,2 μm Filter, Sartorius, Göttingen), mit konzentrierter HCl angesäuert (pH \approx 2), eine Tri-fluoressigsäure-Konzentration (TFA) von 0,1 % (v/v) eingestellt und auf eine auf Octadecylphasen (C18) basierende Säule (Delta-Pak™, 25×100 mm, 15 μm , 100 Å, in einem PrepLCTM 25 mm RC-Modul (*radial compression module*), Waters, Eschborn) mit einer Flussrate von maximal 8 ml/min aufgetragen. Für analytische Zwecke wurde ebenfalls eine C18-Säule (Delta-Pak™ C18 8×100 mm, 15 μm ; 100 Å, in einem 8×10 RC-Modul, Waters, Eschborn) eingesetzt. Mit 0,1 % (v/v) TFA in H₂O (Eluent A) und einem Gemisch aus Acetonitril : H₂O im Verhältnis 4 : 1 (v/v) mit ebenfalls 0,1 % TFA (v/v) (Eluent B) wurde bei einer Flussrate von bis zu 10 ml/min bzw. im Fall eines analytischen RP-HPLC-Laufes von bis zu 4 ml/min mit einem zweiphasigen (20-80 % (v/v) Anteil Eluent B in 30 min und 80-100 % in 2 min oder 20-50 % (v/v) Anteil Eluent B in 30 bzw. 60 min und 50-100 % in 10 min) oder dreiphasigen konstanten Gradienten (20-50 % (v/v) Anteil Eluent B in 20 min, 50-60 % in 15 min, 60-100 % in 5 min) eluiert. Die Eluation wurde durch Messung der Absorption bei 220 und 280 nm verfolgt (Waters 2487 Dual Wavelength Detektor, Waters, Eschborn) und

proteinhaltiges Eluat in Fraktionen gesammelt, die mittels Vakuumkonzentration (Christ Alpha RVC Vakuumzentrifuge, Christ, Osterode; Hochvakuumpumpe, Balzers Pfeiffer, Aßlar) getrocknet wurden. Auf diese Weise gereinigtes Protein wurde für weitere analytische Verfahren, zur Überprüfung der biologischen Aktivität (Kap. 3.14) oder für die NMR-Spektroskopie (Kap. 3.15) eingesetzt.

3.8 Massenspektrometrie

Die molekulare Masse des LEKTI-Domäne 15-Proteins GPdom15 wurde mit einem Reflectron MALDI-TOF-Massenspektrometer (*matrix-assisted laser desorption/ionisation - time of flight*; Voyager, Perseptive Biosystems, Houston, USA) von Dr. Peter Kreutzmann (IPF PharmaCeuticals, Hannover) analysiert. Außerdem wurden Elektrospray-Massenspektren (ESI-Massenspektren) auf einem LCT *time of flight mass spectrometer* (Micromass Limited, Wythenshawe, UK) am Lehrstuhl für Bioorganische Chemie der Universität Bayreuth aufgenommen, wofür jeweils 50 bis 100 µl einer Salz-freien Proteinlösung (5 bis 50 µM) eingesetzt wurden. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem lehrstuhleigenen Programm ESICConverter (Ulrich Scheckenhofer, *unveröffentlicht*) und mit den über die Internet-Homepage des ExPASy (*Expert Protein Analysis System*) Molecular Biology Servers (<http://www.expasy.org>; Gasteiger *et al.*, 2003) zugänglichen Online-Programmen PeptideMass (Wilkins *et al.*, 1997; Wilkins *et al.*, 1998), FindPept (Gattiker *et al.*, 2002 a) und ProteinProspector (Clauser *et al.*, 1999).

3.9 Aminoterminaler Sequenzierung

Die Sequenz der ersten 16 Aminosäuren der rekombinanten LEKTI-Domäne 15 (GPdom15) sowie die der nach Trypsinspaltung erhaltenen Fragmente wurden von Dr. Peter Kreutzmann (IPF PharmaCeuticals, Hannover) mittels aminoterminaler Sequenzierung analysiert.

3.10 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Zur Ermittlung der Proteinkonzentration wurde ein BCA *Protein Assay Kit* (Pierce, Rockford, USA) eingesetzt.

In Kombination mit einem Biuret-Assay wird hierbei Bicinchoninsäure (BCA) als Detektionssystem verwendet (Smith *et al.*, 1985). Die Peptidbindung, aber auch Cystein, Cystin, Tyrosin und Tryptophan können in alkalischer Lösung Cu^{2+} - zu Cu^{+} -Ionen reduzieren (Wiechermann *et al.*, 1988), welche spezifisch mit BCA zu einem violetten Komplex reagieren. Die Absorp-

tion dieses Komplexes nimmt mit steigender Proteinkonzentration über einen weiten Bereich (20 bis 2000 µg Protein pro ml) linear zu. Mit Hilfe von Referenz-Proteinlösungen bekannter Konzentrationen kann über die Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm die zu bestimmende Konzentration der gewünschten Proteinlösung ermittelt werden, wobei die Intensität der Farbstoffbildung und somit die Sensitivität des Testes unter anderem über die Temperatur beeinflusst werden kann.

Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben, wobei die Absorptionsmessungen an einem Microplate Reader (Modell 550, Biorad, München) bei einer Wellenlänge von 570 nm erfolgte. Als Referenz diente eine Rinderserumalbumin-(BSA)-Lösung (Sigma, München) bekannter Konzentration.

Eine näherungsweise Bestimmung der Proteinkonzentrationen erlaubte die Absorptionsmessung mit einem Uvikon 930 Zweistrahl-Spektralphotometer (Kontron, Eching) oder mit einem Einstrahlphotometer (Helios γ Spektrophotometer, Thermo Spectronic, Cambridge, UK). Hierzu wurde die Absorption der Proteinlösung bei einer Wellenlänge von 280 nm (A_{280}) in UV-Einmal-Plastikküvetten (Brand, Wertheim) mit einer Schichtdicke von 1 cm oder Schwarzwand-Quarzküvetten (Hellma, Mühlheim) mit 0,5 cm oder 1 cm Schichtdicke bestimmt und die Konzentration über das Lambert-Beer'sche Gesetz (Gleichung 3-1) berechnet.

$$A = c \cdot d \cdot \epsilon \quad (\text{Gleichung 3-1})$$

A = gemessene Absorption

d = Schichtdicke der Küvette [cm]

c = molare Konzentration [M]

ϵ = molarer Extinktionskoeffizient [$\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$]

Der Extinktionskoeffizient ϵ_{280} wurde aus der Aminosäurezusammensetzung des jeweiligen Proteins nach Gill und von Hippel (1989) ermittelt, wonach für jeden Tryptophanrest $5690 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, pro Tyrosinrest $1280 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ und $120 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ für jede vorhandene Disulfidbrücke zu addieren ist. Für GPdom15 und GPdom15kurz ergaben sich $4200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ und für GPdom15ldti $1640 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, für Trx-EK-dom15, Trx-PreS-dom15 und Trx-PreS-dom15kurz wurde $18260 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ und für Trx-PreS-dom15ldti $15700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ errechnet.

3.11 Elektrophoretische Verfahren

3.11.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Analyse von Plasmidpräparationen (Kap. 3.6.1) und Restriktionen (Kap. 3.6.3), sowie zur präparativen Gewinnung von DNA-Fragmenten (Kap. 3.6.4) in einer, je nach Volumen und Anzahl der Proben, horizontalen *DNA-Sub*TM-

Cell- oder *Mini-DNA-SubTM-Cell*-Gelkammer (Biorad, München) durchgeführt. Nach Aufkochen von 0,8 % (w/v) bzw. 1,5 % (w/v) Agarose in TBE-Puffer (90 mM Tris, 2 mM EDTA, 90 mM H₃BO₃, pH 8,0) und Zugabe von 5 µl einer 1 %igen Ethidiumbromid-Lösung pro 100 ml Lösung wurden Gele der Größe 15 × 15 cm oder 10 × 6 cm gegossen bzw. die Lösung bei 60 °C aufbewahrt. Die Proben wurden jeweils mit 1/5 Volumen Auftragspuffer (50 mM EDTA, 50 % (v/v) Glycerin, 0,15 % (w/v) Bromphenolblau, 0,15 % (w/v) Xylencyanol) versetzt und dann auf das Gel aufgetragen. Als Längenstandards dienten *Hind*III restringierte DNA des Bakteriophagen λ (Fragmentgrößen: 23130; 9415; 6557; 4631; 2322; 2027; 564; 125 bp), 100 bp ladder Standard (MBI-Fermentas), 3000 bp ladder Standard (MBI-Fermentas), oder *Msp*I verdaute pUC19-DNA (vgl. Kap. 3.4). Die Elektrophorese erfolgte mit TBE-Elektrodenpuffer bei einer konstanten Spannung von 100 V PowerPac 3000-Netzgerät (Biorad, München). DNA-Banden wurden durch Fluoreszenz auf einem Transilluminator sichtbar gemacht und mit einem Geldokumentationssystem (GelDoc 2000, Biorad, München) dokumentiert. Ausgeschnittene DNA-Banden wurden wie in Kap. 3.6.2 beschrieben aus dem Agarosegel extrahiert.

3.11.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur analytischen Trennung von Proteingemischen und zur Reinheitskontrolle von Proteinpräparationen wurde für Proteine mit einem Molekulargewichtsbereich zwischen 10 und 100 kDa die denaturierende Elektrophorese mit Polyacrylamid-Gelen in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat (SDS, *sodium dodecyl sulfate*) im diskontinuierlichen System nach Laemmli (1970) verwendet. Für einen Trennbereich unterhalb 15 kDa wurden Gele in einem ebenfalls diskontinuierlichen Tricinpuffersystem nach Schägger und von Jagow (1987) eingesetzt. Die Elektrophorese erfolgte mit Gelen der Größe 10 × 8 cm und einer Dicke von 0,75 cm vertikal in Mighty Small SE250/260 Gelelektrophoresekammern (Hoefer/Amersham Biosciences, Freiburg). Nach der Färbung wurde die erreichte Auftrennung mit einem Geldokumentationssystem (GelDoc 2000, Biorad, München) dokumentiert.

19 %ige SDS-Gele nach Laemmli

Das Trenngel bestand aus 19 % (w/v) Acrylamid, 0,46 % (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid, 0,1 % (w/v) SDS und 375 mM Tris/HCl, pH 8,8. Das Sammelgel setzte sich zusammen aus 7,5 % (w/v) Acrylamid, 0,21 % (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid, 0,1 % (w/v) SDS und 62 mM Tris/HCl, pH 6,8. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 13 µl N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) und 200 µl 10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfatlösung

(APS) pro 20 ml Gellösung gestartet. Die Elektrophorese erfolgte in einem Laufpuffer mit 25 mM Tris/HCl, 197,5 mM Glycin, pH 8,3 und 0,1 % (w/v) SDS bei einer konstanten Stromstärke von 26 mA. Als Molekulargewichtsstandard diente der *low-range* Standard von Bio-Rad (München; Kap. 3.4).

SDS-Gele nach Schägger und von Jagow

Das Trenngel bestand aus 16 % (w/v) Acrylamid, 2 % (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid, 0,1 % (w/v) SDS und 1 M Tris/HCl, pH 8,45. Das Sammelgel setzte sich zusammen aus 4 % (w/v) Acrylamid, 0,24 % (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid, 0,1 % (w/v) SDS und 775 mM Tris/HCl, pH 8,45. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 8 µl TEMED und 40 µl 10 % (w/v) APS pro 20 ml Gellösung gestartet. Die obere Pufferkammer wurde mit Kathodenpuffer (0,1 M Tris/HCl, pH 8,25, 0,1 M Tricin, 0,1 % (w/v) SDS), die untere mit Anodenpuffer (0,2 M Tris/HCl, pH 8,9) befüllt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 28 mA im Sammelgel und 40 mA im Trenngel. Als Molekulargewichtsstandard wurde der Fluka-Molekulargewichtsstandard (Fluka, Neu-Ulm) verwendet.

Probenvorbereitung

Die zu analysierenden Proteinlösungen wurden mit dem gleichen Volumen Probenpuffer 2 × Roti-Load® (Roth, Karlsruhe) versetzt, für 10 min bei 95 °C denaturiert und je nach Konzentration der Proteinlösung zwischen 5 µl und 20 µl der Probe auf das Gel aufgetragen. Zellpellets (Kap. 3.8) wurden in 50 µl 2 × Roti-Load® (Roth, Karlsruhe) resuspendiert und bei 95 °C für mindestens 10 min denaturiert. Zur Analyse wurden jeweils 10 µl eingesetzt.

Coomassie-Blau-Färbung

Zum Färben der Proteinbanden wurden die Gele unmittelbar nach der Elektrophorese für 15 bis 30 min in Protein-Färbelösung (0,05 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250, 45 % (v/v) Methanol, 9,2 % (v/v) Essigsäure), anschließend für 30 min in Entfärbelösung I (25 % (v/v) Methanol, 1 % (v/v) Essigsäure) und bis zum vollständigen Entfärben des Gelhintergrundes in Entfärbelösung II (5 % (v/v) Methanol, 7 % (v/v) Essigsäure) auf einem Horizontalschüttler bei 30 rpm geschwenkt.

3.12 Bestimmung der inhibitorischen Aktivität

3.12.1 Test auf Reduzierung der HIV-Infektionsrate

In Kooperation mit Dr. med. Karin Metzner am Institut für Klinische und Molekulare Virologie der Universität Erlangen wurde in einem Standardtest der Einfluss der beiden LEKTI-Do-

mäne 15-Varianten GPdom15 und GPdom15kurz auf die Infektion von HI-Viren (HIV_{NL4-3}) gegenüber 174xCEM-Zellen einer humanen Zelllinie überprüft. Hierzu wurden 5×10^4 174xCEM-Zellen mit 10 bzw. 100 TCID₅₀ (*tissue culture infective dose*₅₀; Verdünnungsfaktor für die eine Gewebekultur zu 50 % infizierende Dosis) HIV_{NL4-3} infiziert, was einer MOI (*multiplicity of infection*; Multiplizität der Infektion) von 0,0002 bzw. 0,002 entspricht. Die Infektion erfolgte dabei in Anwesenheit von GPdom15 und GPdom15kurz (jeweils 5 µM und 50 µM). Zur Kontrolle wurden Zellen in Anwesenheit des Reverse-Transkriptase-Inhibitors β-L(-)-2',3'-Dideoxy-3'-Thiacytidin (= (-)3TC; Lamivudin; z.B. Anderson, 2002) in einer zu 95 % inhibitorisch wirkenden Konzentration sowie ohne vorherige Inhibitorzugabe infiziert. Zum Ausschluss einer eventuellen toxischen Wirkung der Inhibitoren wurden Zellen nur unter Zugabe von GPdom15kurz und GPdom15, bzw. (-)3TC (IC₉₅) kultiviert. Pro Ansatz wurden an den Tagen 2, 4 und 6 nach Infektion 2×150 µl Proben entnommen und die Menge an gebildetem viralen Protein p24 mittels spezifischem ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) detektiert. Nach jeder Probenentnahme wurden 300 µl Medium mit entsprechender Inhibitor-Konzentration zugegeben und so das Zellkulturvolumen (1 ml) konstant gehalten.

3.12.2 Test auf Inhibierung von Trypsin

Die drei Varianten der LEKTI-Domäne 15, GPdom15, GPdom15kurz und GPdom15ldti, wurden auf ihre Fähigkeit zur Inhibierung der Serinproteinase Trypsin getestet, wobei die Aktivität von Trypsin mit Hilfe des chromogenen, synthetischen Substrats N-α-Benzoyl-D,L-arginin-p-nitroanilid (D,L-BAPNA; Erlanger *et al.*, 1961) spektrometrisch erfasst wurde. Die bei der Spaltung von L-BAPNA freigesetzte Menge an p-Nitroanilin korreliert mit der verbleibenden Menge aktiven Enzyms und kann durch Messung der Absorption der Reaktionslösung bei einer Wellenlänge von 405 nm detektiert werden, wobei die Extinktion des nicht gespaltenen Substrates bei dieser Wellenlänge vernachlässigbar gering ist (Fritz *et al.*, 1966; Kassell, 1970; Johnson *et al.*, 2002). So wurden die drei Domäne 15-Varianten in PBS (*phosphate buffered saline solution*; 137 mM NaCl, 27 mM KCl, 10 mM Natrium-Phosphat, pH 7,4) gelöst (jeweils vier Ansätze mit einer Endkonzentration von 50, 100, 200, 500 und 1000 nM) und für 30 min in einer Mikrotiterplatte mit Trypsin (Endkonzentration: 4,17 µg/ml; Fluka, Buchs) präinkubiert. Sofort nach Zugabe der BAPNA-Lösung (Endkonzentration: 1 mM; Stammlösung mit 20 % (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO) und 80 % (v/v) PBS) wurde die Proteinaseaktivität bei Raumtemperatur (21 °C) durch Messung der Absorption bei 405 nm mittels Microplate Reader (BioRad, München) 100 min lang verfolgt. Als Kontrolle dienten

BAPNA-Lösungen mit und ohne Enzym und/oder Inhibitor (Zhu *et al.*, 2003; Karp, 1996).

3.12.3 Test auf Inhibierung weiterer Proteinasen

Die Überprüfung der Varianten der LEKTI-Domäne 15 auf ihre Fähigkeit neben Trypsin noch weitere Serinproteinasen zu inhibieren wurde in Kooperation mit Prof. Dr. med. Christian P. Sommerhoff an der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie der Universität München durchgeführt. Dabei wurde auch die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_i der entsprechenden Enzym/Inhibitor-Komplexe bestimmt.

Auf eine Inhibierung durch die LEKTI-Domäne 15-Varianten wurden Trypsin (EC 3.4.21.4), β -Tryptase (EC 3.4.21.59), Chymotrypsin (EC 3.4.21.1), Subtilisin (EC 3.4.21.62), PMN-Elastase aus humanen polymorphkernigen Granulozyten (EC 3.4.21.37), Thrombin (EC 3.4.21.5), Faktor Xa (EC 3.4.21.6), Plasmin (EC 3.4.21.7), Urokinase (EC 3.4.21.73) sowie Gewebekallikrein vom Schwein (*Sus scrofa*) und rekombinant humanes Kallikrein hK5 (*human Kallikrein 5*; EC 3.4.21.35), das auch als *stratum corneum tryptic enzyme* (SCTE) bezeichnet wird, getestet. Für Trypsin, Tryptase, Thrombin und Chymotrypsin wurde zunächst der enzymatisch aktive Anteil der jeweiligen Proteinaselösung durch *burst*-Titration der „*active-site*“ (aktives Zentrum) mit 4-Guanidinbenzoesäure-4-nitrophenylesterhydrochlorid oder dem fluoreszenten Analogon 4-Methylumbelliferyl-p-Guanidinbenzoesäure ermittelt (Chase & Shaw, 1967; Chase & Shaw, 1969; Kezdy *et al.*, 1965). Dabei wird der Effekt genutzt, dass die Deacylierung der Serinseitenkette den langsamsten Schritt der Substratumsetzung darstellt und daher zu Reaktionsbeginn das zunächst rascher als in der Gleichgewichtsphase freigesetzte p-Nitrophenol einen sprunghaften Anstieg (*burst*) der Absorption bzw. Fluoreszenz verursacht.

Die Bestimmung der Konzentration an aktivem Inhibitor erfolgte nach Präinkubation einer konstanten Trypsinmenge mit Inhibitorlösungen in verschiedenen Verdünnungen über die verbleibende Enzymaktivität gegenüber einem synthetischen Substrat (z.B. bz-Arg-AMC; Benzoyl-Arginyl-7-Amino-4-Methylcumarin) ebenfalls über die Quantifizierung des freigesetzten fluorogenen Reaktionsproduktes (z.B. AMC) über dessen Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge ($\lambda_{\text{ex}} = 380 \text{ nm}$) und einer Emissionswellenlänge ($\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$). Dabei wurde die Trypsinkonzentration so gewählt, dass mit zunehmendem Inhibitoranteil die restliche Aktivität der Proteinase linear abnahm. Aus den resultierenden Hemmkurven konnte unter der Annahme einer stöchiometrischen 1:1-Bindung zwischen Enzym und Inhibitor durch Anpassung der Gleichung für festbindende Inhibitoren (Gleichung 3-2; Morrison, 1969) mittels li-

neerer Regression die InhibitorKonzentration berechnet werden.

Unter Bedingungen, bei der die Restaktivität nicht linear abnahm, wurde die scheinbare Dissoziationskonstante K_{iapp} des Enzym/Inhibitor-Komplexes mittels nicht-linearer Regressionsanpassung von Gleichung 3-2 erhalten (Morrison, 1969).

$$\frac{v_i}{v_0} = 1 - \frac{[E_t] + [I_t] + K_{iapp} - \sqrt{([E_t] + [I_t] + K_{iapp})^2 - 4 [E_t] [I_t]}}{2 [E_t]} \quad (\text{Gleichung 3-2})$$

v_i = Reaktionsgeschwindigkeit in Gegenwart eines Inhibitors

v_0 = Reaktionsgeschwindigkeit in Abwesenheit eines Inhibitors

K_{iapp} = scheinbare Dissoziationskonstante des Enzym/Inhibitor-Komplexes bei einer bestimmten Substratkonzentration

$[E_t]$ = Gesamtkonzentration des Enzyms

$[I_t]$ = Gesamtkonzentration des Inhibitors

Die tatsächliche Gleichgewichtsdissociationskonstante K_i wurde schließlich nach Gleichung 3-3 durch Extrapolation auf eine Substratkonzentration von Null bestimmt.

$$K_i = \frac{K_{iapp}}{1 + \frac{[S]}{K_M}} \quad (\text{Gleichung 3-3})$$

K_i = tatsächliche Gleichgewichtsdissociationskonstante

K_{iapp} = scheinbare Dissoziationskonstante des Enzym/Inhibitor-Komplexes bei einer bestimmten Substratkonzentration

$[S]$ = Substratkonzentration

K_M = Michaelis-Menten-Konstante des Substrats

Über die pro Zeit umgesetzte Substratmenge wurde die Geschwindigkeit der Substratspaltung und aus den Reaktionsgeschwindigkeiten bei verschiedenen Substratkonzentrationen durch nicht lineare Regressionsanalyse der Michaelis-Menten-Gleichung (Gleichung 3-4; Michaelis & Menten, 1913) die Werte für K_M und v_{max} ermittelt.

$$v(S) = \frac{[S] v_{max}}{[S] + K_M} \quad (\text{Gleichung 3-4})$$

$v(S)$ = beobachtete Reaktionsgeschwindigkeit bei der Substratkonzentration S

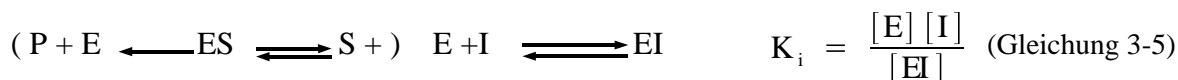
v_{max} = maximale Reaktionsgeschwindigkeit bei Substratsättigung

$[S]$ = Substratkonzentration

K_M = Michaelis-Menten-Konstante des Substrats

Erst über diesen Umweg ist es möglich, die inhibitorische Gleichgewichtsdissociationskonstante K_i für die reversible Inhibierung zwischen freiem Enzym (E), freiem Inhibitor (I) und

Enzym/Inhibitor-Komplex (EI) zu bestimmen, da die Konstante K_i für das Gleichgewicht ohne Anwesenheit von Substrat definiert ist (Gleichung 3-5) und die Konkurrenzreaktion des Substrats (S) mit dem Enzym das Gleichgewicht beeinflusst.



K_i = inhibitorische Gleichgewichtsdissoziationskonstante

$[E]$ = Konzentration an ungebundenem Enzym

$[I]$ = Konzentration an ungebundenem Inhibitor

$[EI]$ = Konzentration des Enzym-Inhibitor-Komplexes

P = Produkte

S = Substrat

ES = Enzym-Substrat-Komplex

3.13 Oxidative Rückfaltung von GPdom15ldti

Zur Reduktion von GPdom15ldti wurde das Protein mit der 20- bis 100-fachen Menge 1,4-Dithiothreitol (DTT) in 5 bis 50 ml (je nach Proteinmenge) Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer (400 mM, pH 8,3) zunächst mit 3,5 M Guanidiniumchlorid mehrere Stunden auf 60 °C erhitzt und das Reaktionsgemisch mittels RP-HPLC (Kap. 3.7.5.4) aufgetrennt. Die Reoxidation erfolgte bei Proteinkonzentrationen von 0,001 bis 0,1 mM in NH_4HCO_3 -Puffer (100 mM, pH 8,3) zunächst mit 2 mM EDTA-Zusatz (Ethyldiamintetraacetat) bei einem zugegebenen L-Cystein-L,L-Cystin-Gemisch im Verhältnis von 1 : 10 : 100 (Protein : Cystin : Cystein) durch Dialyse (Spectra/Por-Dialyseschlauch, 1000 Da Ausschlussgrenze, Roth, Karlsruhe) bei 4 °C unter mehrfachem Pufferwechsel. Nach erneutem RP-HPLC-Schritt (Kap. 3.7.5.4) bzw. Dialyse gegen *aqua bidest.* wurden die Protein-haltigen Lösungen durch Lyophilisieren getrocknet oder direkt für die weitere Charakterisierung mittels Massenspektrometrie (Kap. 3.8), CD- (Kap. 3.14.2) bzw. NMR-Spektroskopie (Kap. 3.15) eingesetzt.

3.14 Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie

3.14.1 Probenvorbereitung

Zur Untersuchung eines möglichen Einflusses des pH-Wertes auf die Fern-UV-CD-Spektren von GPdom15, GPdom15kurz und GPdom15ldti wurde jeweils eine Lösung mit 35 μM Protein in Kalium-Phosphat-Puffer (10 mM) bei einem pH-Wert zwischen 5,0 und 9,0 verwendet (pH 5,0; 6,0; 6,4; 7,0; 7,4; 8,0; 9,0). Zusätzlich wurden jeweils ein CD-Spektrum von nur in *aqua bidest.* gelöstem Protein (pH 4,5) aufgenommen. Reoxidiertes GPdom15ldti-Protein (Kap. 3.13) wurde nach Dialyse gegen *aqua bidest.* (pH 4,5) analysiert.

3.14.2 Gerät und Messbedingungen

CD-spektroskopische Untersuchungen wurden an einem Jasco J-810 Spektropolarimeter (Jasco, Gross-Umstadt) bei 25 °C in Rechteckküvetten (Helma, Müllheim) mit einer Schichtdicke von 1 mm durchgeführt. Die Spektren wurden für einen Wellenlängenbereich von 260-183 nm mit einer Bandbreite von 1 nm, einer Auflösung von 0,2 nm, einer Empfindlichkeit von 100 mdeg und einer Messgeschwindigkeit von 20 bis 50 nm/min gemessen. Es wurden jeweils 10 Spektren akkumuliert. Entsprechende Pufferspektren wurden unter gleichen Bedingungen aufgenommen und subtrahiert. Die aus dem Differenzspektrum erhaltene Elliptizität Θ wurde mit Hilfe von Gleichung 3-6 (Schmid, 1989) in die mittlere molare Elliptizität pro Aminosäurerest $[\Theta]_{\text{MRW}}$ umgerechnet und gegen die Wellenlänge aufgetragen.

$$[\Theta]_{\text{MRW}} = \frac{100 \Theta}{c d N_A} \quad (\text{Gleichung 3-6})$$

c = molare Proteinkonzentration [M]

N_A = Anzahl der Aminosäuren

d = Schichtdicke der Küvette [cm]

Θ = gemessene Elliptizität [deg]

$[\Theta]_{\text{MRW}}$ = mittlere molare Elliptizität pro Aminosäurerest [deg cm² dmol⁻¹]

Ferner wurde der thermische Übergang von GPdom15 durch Detektion der Elliptizität bei 208 nm verfolgt. In einer Rechteckküvette (Helma, Müllheim) mit einer Schichtdicke von 1 cm wurde hierzu die Proteinlösung (5 µM in 10 mM Kalium-Phosphatpuffer, pH 7,0) mittels Peltier Kontrollelement und CDF-426S Temperatureinheit (Jasco, Gross-Umstadt) bei einer konstanten Heizrate von 1 °C/min von 20 °C auf 100 °C erhitzt und bei gleicher Rate wieder auf 20 °C abgekühlt. Vor dem Aufheizen und nach dem Abkühlen (jeweils bei 20 °C) sowie bei 90 °C wurden zusätzlich Fern-UV-CD-Spektren mit den oben aufgeführten Messparametern aufgenommen.

3.14.3 Evaluierung der CD-Spektren

Mit Hilfe der Programme *spectra evaluation* (Jasco, Großumstadt) und *CDPro* (Sreerama *et al.*, 2001; <http://lamar.colostate.edu/~sreeram/>) wurden die gemessenen Fern-UV-CD-Spektren hinsichtlich der Anteile der einzelnen Sekundärstrukturelemente interpretiert. Das experimentell ermittelte Spektrum wird dabei als eine Linearkombination von Basisspektren erfasst, welche die verschiedenen Strukturtypen 3₁₀- oder α-Helix, β-Faltblatt, β-Turn und *random coil* repräsentieren.

3.15 NMR-Spektroskopie

3.15.1 Probenvorbereitung

Zur Durchführung von NMR-Experimenten wurde lyophilisiertes Protein in autoklaviertem *aqua bidest.* oder sterilfiltriertem (Minisart, 0,2 µm Filter, Sartorius, Göttingen) Kalium-Phosphat-Puffer (20 bzw. 50 mM, pH 6,4) gelöst, die Proteinkonzentration (Kap. 3.10) und der pH-Wert überprüft und D₂O (99,9 Atom% D, Endkonzentration: 10 % v/v) sowie zur Vermeidung mikrobiellen Befalls NaN₃ (Endkonzentration: 0,03 % w/v) zugegeben. Eventuell vorhandene Schwebeteilchen wurden vor Abfüllen der Proteinlösungen in 5 mm Ultra Precision NMR-Proberöhrchen (Norell, Landsville, NJ, USA) bzw. Shigemi NMR-Proberöhrchen (Campro Scientific, Veendendaal) abzentrifugiert (13000 × g, 10 min). Die Lagerung der Proben erfolgte nach Trocknung durch Vakuumkonzentration (Membranpumpe, Vacuubrand, Wertheim) bei –20 °C.

3.15.2 Geräte und Messbedingungen

Alle NMR-Experimente wurden an Bruker Avance Spektrometern (DRX400, DRX600 oder AV700 UltraShield, Bruker, Karlsruhe) bei Protonenresonanzfrequenzen von 400,13, 600,13 und 700,20 MHz durchgeführt. Dabei sind ausschließlich inverse ¹H/¹³C/¹⁵N/(³¹P) Probenköpfe mit aktiv abgeschirmten Gradientenspulen in z-Richtung (DRX400) bzw. in alle drei Raumrichtungen (DRX600; AV700) verwendet worden. Die Temperatur wurde mittels einer BVT2000- bzw. BVT3000-Einheit (Bruker, Karlsruhe) reguliert. Die Referenzierung der ¹H chemischen Verschiebungen erfolgte relativ zu 2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonat (DSS) in D₂O als externen Standard. Die ppm-Werte der ¹⁵N-Verschiebungen wurden indirekt über das Frequenzverhältnis der Nullpunktsfrequenzen ($\Xi(^1\text{H}) = 100,00000 \text{ Mhz}$, $\Xi(^{15}\text{N}) = 10,1329118 \text{ Mhz}$, Live *et al.*, 1984; Markley *et al.*, 1998) geeicht. Als Signal für den Feld-Frequenz-Lock wurde die Resonanzfrequenz des zugesetzten D₂O verwendet.

Die Messungen erfolgten im phasensensitiven Modus mit Quadraturdetektion in beiden Zeitdimensionen unter Verwendung der States-TPPI-Technik (*time proportional phase incrementation*; States *et al.*, 1982; Marion *et al.*, 1989) bzw. bei Experimenten mit abschließendem Gradientenecho zur Kohärenz-Selektion (Sattler *et al.*, 1995; Schleucher *et al.*, 1994) mittels Echo/Antiecho-Technik (Kay *et al.*, 1992). Die Entkopplung der Heterokerne während der Aufnahme des FID (*free induction decay*) wurde durch die GARP-Sequenz (Shaka *et al.*, 1985) erreicht. Die Wasserresonanz wurde bei homonuklearen ¹H-Experimenten durch *Excitation Sculpting* (Hwang & Shaka, 1995), bei den Experimenten mit Detektion der Amidpro-

tonen durch Verwendung einer 3-9-19 *WATERGATE*-Sequenz (Sklenar *et al.*, 1993) mit *Waterflipback* (Grzesiek & Bax, 1993) und in den übrigen 3D-Experimenten durch Kohärenz-Selektion mit gepulsten Feldgradienten (Schleucher *et al.*, 1994) unterdrückt. Zur Breitbandentkopplung von Protonen diente die *WALTZ-16*-Sequenz (Shaka *et al.*, 1983).

3.15.3 NMR-Experimente

Für eindimensionale Protonenspektren wurden je nach Probenkonzentration 16 bis 1024 Akkumulationen (*scans*) mit bis zu 16384 komplexen Datenpunkten bei einer spektralen Weite von bis zu 16,4 ppm summiert.

Die wichtigsten Aufnahmeparameter für die durchgeführten mehrdimensionalen Experimente sind nachstehend tabellarisch aufgeführt. Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle Experimente an einem DRX600 Spektrometer bei 298 K aufgenommen. Die verwendeten Pulsprogramme (PP) wurden für die jeweilige Spektrometer-Ausstattung optimiert (Dr. Kristian Schweimer, Universität Bayreuth; Schweimer, 2000) und beruhen auf den in der Referenz (R) beschriebenen grundlegenden Experimenten.

Tab. 3.4: Übersicht über die Aufnahmeparameter der mehrdimensionalen NMR-Experimente

Experiment	P	MT	NS	D	N	SW	TD	Anmerkung	R	PP
<i>GPdom15</i>										
NOESY	A	150	32	F1	¹ H	7183,9	4096	Temp. = 296 K	(1)	(a)
				F2	¹ H	7183,9	1024			
NOESY	A	300	32	F1	¹ H	7183,9	4096	Temp. = 296 K	(1)	(a)
				F2	¹ H	7183,9	1024			
TOCSY	A	60	64	F1	¹ H	8389,3	1024	Temp. = 296 K	(2)	(b)
				F2	¹ H	7183,9	711			
TOCSY	A	80	64	F1	¹ H	8389,3	1024	Temp. = 296 K	(2)	(b)
				F2	¹ H	7183,9	512			
COSY	A		32	F1	¹ H	7122,5	4096	Temp. = 296 K	(3)	(c)
				F2	¹ H	7183,9	800			
NOESY	A	200	64	F1	¹ H	7183,9	4096		(1)	(a)
				F2	¹ H	7183,9	512			
TOCSY	A	70	128	F1	¹ H	8389,3	4096		(2)	(b)
				F2	¹ H	8389,3	800			
COSY	A		80	F1	¹ H	8389,3	1024		(3)	(c)
				F2	¹ H	8389,3	512			
NOESY	B	150	64	F1	¹ H	7788,2	4096		(1)	(a)
				F2	¹ H	7788,2	640			
NOESY	B	300	64	F1	¹ H	7788,2	4096		(1)	(a)
				F2	¹ H	7788,2	505			

Experiment	P	MT	NS	D	N	SW	TD	Anmerkung	R	PP
TOCSY	B	60	64	F1	¹ H	7788,2	4096		(2)	(b)
				F2	¹ H	7788,2	640			
COSY	B		64	F1	¹ H	7788,2	4096		(3)	(c)
				F2	¹ H	7788,2	640			
NOESY	C	200	64	F1	¹ H	8389,3	2048	11 h nach D ₂ O-Zugabe	(1)	(d)
				F2	¹ H	8389,3	640			
NOESY	C	120	64	F1	¹ H	8389,3	2048	33 h 12 min n. D ₂ O-Zugabe	(1)	(d)
				F2	¹ H	8389,3	640			
TOCSY	C	80	16	F1	¹ H	8389,3	2048	10 min nach D ₂ O-Zugabe	(2)	(e)
				F2	¹ H	8389,3	256			
TOCSY	C	80	32	F1	¹ H	8389,3	2048	60 min nach D ₂ O-Zugabe	(2)	(e)
				F2	¹ H	8389,3	640			
COSY	C		16	F1	¹ H	8389,3	2048	54 h nach D ₂ O-Zugabe	(3)	(f)
				F2	¹ H	8389,3	1024			
<i>¹⁵N-GPdom15</i>										
¹ H, ¹⁵ N-HSQC	D		32	F1	¹ H	8389,3	2048		(4)	(g)
				F2	¹⁵ N	1824,6	256			
¹ H, ¹⁵ N-HSQC	D		8	F1	¹ H	7183,9	2048		(4)	(g)
				F2	¹⁵ N	1824,6	384			
¹ H, ¹⁵ N, ¹⁵ N-HMQC-NOESY-HSQC	D	150	8	F1	¹ H	7183,9	1024		(5)	(h)
				F2	¹⁵ N	1824,6	96			
				F3	¹⁵ N	1824,6	64			
¹ H, ¹ H, ¹⁵ N-TOCSY-HSQC	D	80	8	F1	¹ H	7183,9	1024		(6)	(i)
				F2	¹ H	7183,9	256			
				F3	¹⁵ N	1824,6	64			
¹ H, ¹ H, ¹⁵ N-NOESY-HSQC	D	150	8	F1	¹ H	7183,9	1024		(7)	(j)
				F2	¹ H	7183,9	256			
				F3	¹⁵ N	1824,6	64			
HNHA	D		8	F1	¹ H	7183,9	1024		(8)	(k)
				F2	¹⁵ N	1824,6	64			
				F3	¹ H	4599,8	180			
<i>GPdom15kurz</i>										
NOESY	E	150	32	F1	¹ H	4789,3	2048	DRX400	(1)	(l)
				F2	¹ H	4789,3	512			
TOCSY	E	80	64	F1	¹ H	4789,3	2048	DRX400	(2)	(m)
				F2	¹ H	4789,3	512			
COSY	E		32	F1	¹ H	4789,3	2048	DRX400	(3)	(n)
				F2	¹ H	4789,3	720			
NOESY	E	150	32	F1	¹ H	7183,9	4096		(1)	(o)
				F2	¹ H	7183,9	720			
NOESY	E	300	32	F1	¹ H	7183,9	4096		(1)	(a)
				F2	¹ H	7183,9	720			

Experiment	P	MT	NS	D	N	SW	TD	Anmerkung	R	PP
TOCSY	E	80	32	F1	¹ H	7183,9	4096		(2)	(b)
				F2	¹ H	7183,9	720			
COSY	E		32	F1	¹ H	7183,9	4096		(3)	(p)
				F2	¹ H	7183,9	1024			
NOESY	F	120	32	F1	¹ H	9124,1	2048	AV700; Probe	(3)	(r)
				F2	¹ H	9124,1	1024	gelöst in D ₂ O		
<i>¹⁵N-GPdom15kurz</i>										
¹ H, ¹⁵ N-HSQC	G		8	F1	¹ H	4789,3	1024	DRX400	(4)	(s)
				F2	¹⁵ N	912,4	384			
¹ H, ¹⁵ N-HSQC	G		16	F1	¹ H	4789,3	1024	DRX400	(4)	(s)
				F2	¹⁵ N	1216,5	384			
¹ H, ¹⁵ N, ¹⁵ N-HMQC- NOESY-HSQC	G		16	F1	¹ H	4789,3	1024	DRX400	(5)	(t)
				F2	¹⁵ N	912,4	64			
				F3	¹⁵ N	912,4	96			
¹ H, ¹ H, ¹⁵ N-TOCSY- HSQC	G	80	8	F1	¹ H	4789,3	1024	DRX400	(6)	(u)
				F2	¹ H	4789,3	256			
				F3	¹⁵ N	912,4	64			
¹ H, ¹ H, ¹⁵ N-NOESY- HSQC	G	120	16	F1	¹ H	4789,3	1024	DRX400	(7)	(v)
				F2	¹ H	4401,5	256			
				F3	¹⁵ N	912,4	64			
HNHA	G		16	F1	¹ H	4789,3	1024	DRX400	(8)	(w)
				F2	¹⁵ N	857,4	56			
				F3	¹ H	3001,0	160			
<i>GPdom15ldti</i>										
TOCSY	H	80	32	F1	¹ H	7183,9	4096		(2)	(b)
				F2	¹ H	7183,9	720			

P = Probe, vgl. Tab. 3.5; MT = Mischzeit(*mixing time*); D = Dimension; NS = Anzahl der akkumulierten FIDs (*number of scans*); SW = Breite des spektralen Fensters (*sweep width*) [Hz]; TD = Anzahl der gemessenen komplexen Datenpunkte (TD, *time domain*); R = Referenz: (1) (Bodenhausen *et al.*, 1984; Jeener *et al.*, 1979); (2) (Braunschweiler & Ernst, 1983; Cavanagh & Rance, 1992); (3) (Aue *et al.*, 1976); (4) (Bax & Grzesiek, 1993; Mori *et al.*, 1995); (5) (Frenkiel *et al.*, 1990, Ikura *et al.*, 1990); (6) (Zhang *et al.*, 1994); (7) (Talluri & Wagner, 1996); (8) (Zhang *et al.*, 1997); PP = Pulsprogramm: (a) noesydpfgse_ks; (b) dipsidpfgse_ks; (c) cosydfgspr_ks; (d) noesyprst2_ks; (e) dipsi2rc_ks; (f) cosydfgs_ks; (g) fhsqcf2_ks; (h) nnhnoesy_ks; (i) tocsyhsqc02_ks; (j) nsyhsqc_ks; (k) hnha_pn; (l) noesydpfgse.ks; (m) dipsidpfgse.ks; (n) cosydfgp.ks; (o) noesytest_ks; (p) cosydfgp.ks; (r) noesyprst.ks; (s) fhsqcN15.ks; (t) nnhnoesy.ks; (u) n15tocsy.ks; (v) n15noesy.ks; (w) hnha2.ks.

Die in Tab. 3.4 mit Abkürzungen angegebenen NMR-Proben hatten die in Tab. 3.5 beschriebene Zusammensetzung.

Tab. 3.5: Übersicht über die Zusammensetzung der in Tab. 3.4 nur mit Abkürzungen angegebenen NMR-Proben

Abk.	Zusammensetzung der NMR-Proben
A	GPdom15, 2,5 mM, in <i>aqua bidest.</i> , pH 4,5, 10 % D ₂ O (v/v), 0,03 % NaN ₃ (w/v)
B	GPdom15, Probe A nach Reinigung mittels RP-HPLC, 2,3 mM, in 50 mM Kalium-Phosphat-Puffer, pH 6,4, 10 % D ₂ O (v/v), 0,03 % NaN ₃ (w/v)
C	GPdom15, lyophilisierte Probe B, 2,3 mM, in reinem D ₂ O (99,996 Atom% D), pH 6,4, 0,03 % NaN ₃ (w/v)
D	GPdom15, ¹⁵ N-markiert (¹⁵ N-GPdom15), 1,6 mM, in 50 mM Kalium-Phosphat-Puffer, pH 6,4, 10 % D ₂ O (v/v), 0,03 % NaN ₃ (w/v)
E	GPdom15kurz, 1,6 mM, in 20 mM Kalium-Phosphat-Puffer, pH 6,4, 10 % D ₂ O (v/v), 0,03 % NaN ₃ (w/v)
F	GPdom15kurz, lyophilisierte Probe E, 1,6 mM, in reinem D ₂ O (99,996 Atom% D), pH 6,4, 0,03 % NaN ₃ (w/v)
G	GPdom15kurz, ¹⁵ N-markiert (¹⁵ N-GPdom15kurz), 0,7 mM, in 20 mM Kalium-Phosphat-Puffer, pH 6,8, 10 % D ₂ O (v/v), 0,03 % NaN ₃ (w/v)
H	GPdom15ldti, 1,6 mM, in 20 mM Kalium-Phosphat-Puffer, pH 6,0, 10 % D ₂ O (v/v), 0,03 % NaN ₃ (w/v)

Zusätzliche NMR-Experimente

Zur Identifizierung von langsam austauschenden Amidprotonen wurden ¹H,¹⁵N-HSQC-Experimente (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*; Mori *et al.*, 1995; Bax & Grzesiek, 1993) mit einer ¹⁵N-markierten Probe von GPdom15 (Probe D, vgl. Tab. 3.5), welche in 500 µl D₂O (99,9 Atom% D) gelöst wurde, durchgeführt. Die ¹H,¹⁵N-HSQC-Spektren, in denen (theoretisch) für jede HN-Gruppe einer Aminosäure ein Peak erscheint, wurden dabei innerhalb der ersten 34 Minuten in einem dreiminütigen Abstand und anschließend im Abstand von 33 min bei 298 K aufgenommen (TD = 128 bzw. 1024; NS = 1; SW = 1824,5 bzw. 7183,9 Hz; Pulsprogramm: hsqcN15se.ks; Bruker Avance Spektrometer DRX600).

Die Messung des heteronuklearen {¹H}¹⁵N NOE von ¹⁵N-markiertem GPdom15 (¹⁵N-GPdom15), bzw. GPdom15kurz (¹⁵N-GPdom15kurz; Probe D, bzw. G, Tab. 3.5) erfolgte mit einer Pulssequenz nach Dayie und Wagner (1994; Pulsprogramm: n15noe.ks), wobei die einzelnen Inkremente der Evolutionszeit in der indirekten Dimension des Referenzspektrums ohne Protonensättigung und des Spektrums mit Sättigung abwechselnd in einem einzigen, kombinierten Experiment detektiert wurden. Das Relaxationsintervall zwischen den einzelnen Akkumulationen betrug dabei 6 s. Die Protonensättigung wurde durch eine Abfolge von 120°-Pulsen hoher Leistung während der letzten 3 s des Experiments erreicht. Für ¹⁵N-

GPdom15kurz und ^{15}N -GPdom15 wurden ein bzw. zwei unabhängige Datensätze bei 298 K ermittelt (TD = 320 bzw. 256, 2048; NS = 16; SW = 1368,4 bzw. 1642,1, 7183.9 Hz; Spektrometer Bruker Avance DRX 600). Der Wert für den $\{^1\text{H}\}^{15}\text{N}$ NOE ergibt sich aus dem Verhältnis der Intensitäten der Resonanzsignale des gesättigten Spektrums zu den entsprechenden ohne Sättigung.

3.15.4 Prozessierung der NMR-Spektren

Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte an einem Sun Ultra Enterprise 450 Server (Sun Microsystems Inc., Palo Alto, USA) mit Hilfe der Programmpakete NDEE (Spinup Inc., Dortmund) und NMRView5.0.4 (Johnson & Blevins, 1994) und mittels am Lehrstuhl entwickelter Programme (Schweimer, 2000). Die FIDs (*free induction decay*) der 1D-Spektren wurden vor der Fouriertransformation mit einer Exponentialfunktion multipliziert. Zur Verbesserung der digitalen Auflösung wurde die Anzahl der Datenpunkte der FIDs aller homonuklearen 2D-Spektren in beiden Zeitdimensionen durch *zerofilling* verdoppelt bis vervierfacht und mit einer um $\pi/4$ oder $\pi/3$ phasenverschobenen Sinusquadratfunktion multipliziert (Cavanagh *et al.*, 1996). Bei den 3D-Spektren wurde der FID vor der Fouriertransformation in jeweils einer der indirekten ^{15}N -Dimension mittels *linear prediction* (Barkhuijsen *et al.*, 1985; Zhu & Bax, 1990) auf die doppelte Länge extrapoliert. Durch *zerofilling* wurde die Anzahl der Datenpunkte in allen Dimensionen auf mindestens die doppelte Länge gebracht und anschließend mit einer um $\pi/2$ oder $\pi/3$ phasenverschobenen Sinusquadratfunktion multipliziert. Dies erfolgte mittels von am Lehrstuhl entwickelten Programmen (Schweimer, 2000) und des NDEE-Softwarepaketes. Falls notwendig, wurde eine Basislinienkorrektur mit einem *Model-free*-Algorithmus (Programm: *base_fast*; Friedrich, 1995; Schweimer, 2000) angewendet.

3.15.5 Analyse der NMR-Spektren

3.15.5.1 Zuordnung der Resonanzen

Voraussetzung für die Berechnung einer hochaufgelösten Struktur ist eine möglichst vollständige Zuordnung der NMR-Signale aller Aminosäuren eines Proteins, da nur so eine eindeutige Interpretation von in dipolaren Wechselwirkung stehenden Kernspins möglich ist und nur so auch eindeutige Distanzinformationen erhalten werden können (Kap. 3.16.2.1).

Nach der Zuordnungsstrategie von Wüthrich (Wüthrich, 1986) nutzt man zunächst die Informationen aus den homonuklearen COSY- und TOCSY-Experimenten, die beide – auf der skalaren Kopplung beruhend – Kerne über Bindungen hinweg miteinander korreliert (Spin-

system). Mit Hilfe der COSY-Technik (*correlated spectroscopy*; Aue *et al.*, 1976; Jeener *et al.*, 1979) erhält man für Kerne, die zwei oder drei Bindungen voneinander getrennt sind, Kreuzresonanzen, während beim TOCSY-Experiment (*total correlated spectroscopy*; Braunschweiler & Ernst, 1983; Cavanagh & Rance, 1992) ein Magnetisierungstransfer zwischen allen skalar gekoppelten Kernen eines Spinsystems erfolgt.

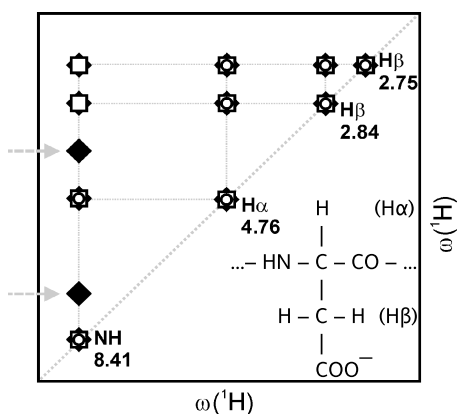


Abb. 3.3: Schematische Darstellung des theoretisch für einen Aspartyl-Rest zu beobachtenden Signal-Musters

Überlagerung der COSY- (○), TOCSY- (□) und NOESY-Signale (♦) mit Beispiel einer dipolaren Wechselwirkung des Amidprotons mit zwei weiteren, nicht zum eigenen Spinsystem gehörenden Protonen (gekennzeichnet durch Pfeil); Werte für Verschiebung der Protonen wie sie für einen Aspartylrest in unstrukturierten Bereichen gefunden werden (Wüthrich, 1986); aus Gründen der Übersichtlichkeit ist das Signalmuster unterhalb der Diagonalen nicht dargestellt.

Nach Identifizierung der einzelnen Spinsysteme anhand der TOCSY- und COSY-Spektren (Abb. 3.3) erfolgt die sequenzspezifische Zuordnung der Spinsysteme mit Hilfe der NOESY-Kreuzresonanzen (NOEs) der NOESY-Aufnahmen (*nuclear overhauser enhancement spectroscopy*; Jeener *et al.*, 1979; Bodenhausen *et al.*, 1984), die Informationen über die räumliche Nähe (bis 5 Å) benachbarter Kerne wiedergeben. Eine theoretische Erklärung der Ursache der direkten magnetischen Wechselwirkung (dipolaren Kopplung) durch den Raum, die bei diesen Experimenten genutzt wird, liefert der Kern-Overhauser-Effekt (*Nuclear Overhauser Effect*, NOE).

Im Unterschied zu den homonuklearen Aufnahmen werden bei den dreidimensionalen ^1H , ^1H , ^{15}N -TOCSY-HSQC- bzw. ^1H , ^1H , ^{15}N -NOESY-HSQC-Spektren (Talluri & Wagner, 1996; Zhang *et al.*, 1994) nur Resonanzen für HN-Gruppen bzw. Kreuzsignale nur für die mit diesen Amidprotonen koppelnden Protonen (Signalleitern) beobachtet. Vergleichbar einem Stapel übereinander liegender 2D-Spektren sind Signalleitern entlang der ^{15}N -Resonanz der Amidproton-Gruppen angeordnet, wodurch die Wahrscheinlichkeit von Signalüberlappung reduziert und daher das sogenannte *chain tracing* in meist sehr übersichtlicher Form ermöglicht wird (Abb. 3.4). Hierzu werden die Signalleitern streifenförmig (*stripes*) aus den ^1H - ^1H -NOESY-Ebenen extrahiert und entsprechend der Primärsequenz nebeneinander angeordnet, so dass man über sequentielle NOEs von der einen Aminosäure zur nächsten gelangt und dann innerhalb der Signalleitern, den Kreuzsignale der eigenen Protonen folgend, den NOEs

entlang der Primärsequenz wie einer Spur folgen kann (Abb. 3.4).

Eine Hilfestellung bei der Identifizierung des benachbarten Restes bietet das ^1H , ^{15}N , ^{15}N -HMQC-NOESY-HSQC-Experiment (Frenkiel *et al.*, 1990, Ikura *et al.*, 1990), das Informationen über die ^{15}N -Verschiebung des Vorgängers bzw. Nachfolgers einer Aminosäure liefert. Nach (möglichst) vollständiger Zuordnung der Resonanzen, wobei das HNHA-Experiment (Zhang *et al.*, 1997) die Identifizierung von Amid- und zugehörigen $\text{H}\alpha$ -Protonen erlaubt, folgt die Auswertung der NOEs (Kap. 3.16.2.1).

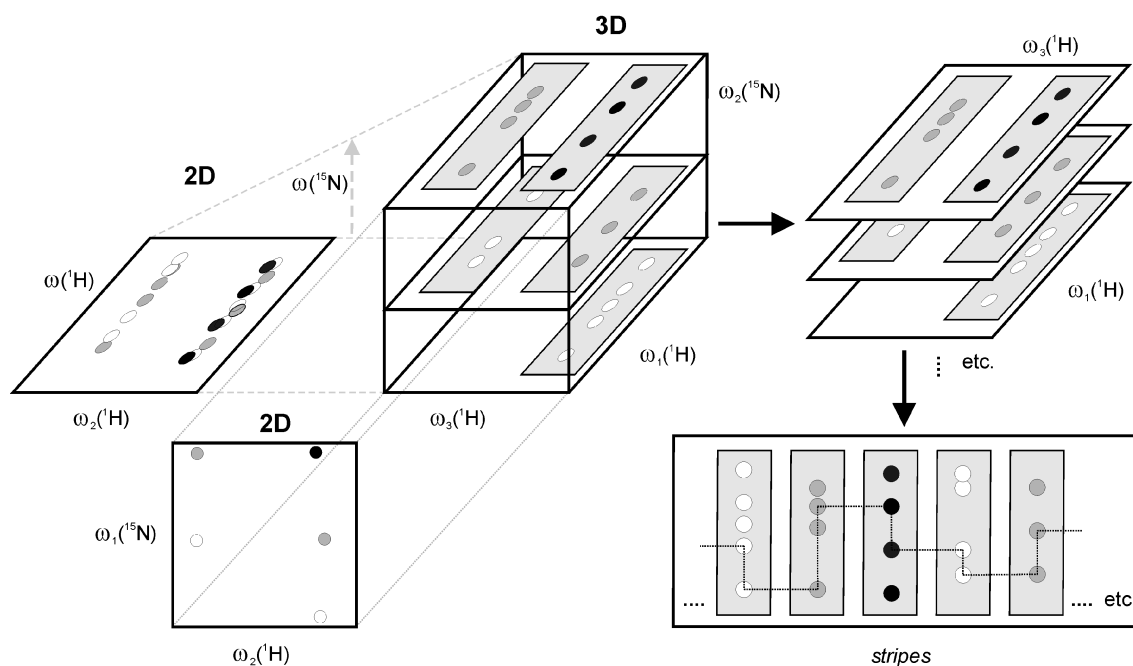


Abb. 3.4: Illustration der Auflösung von Signalüberlagerungen mit Hilfe von ^{15}N -editierten Spektren sowie des Extrahierens von NOESY-Leitern in Form von stripes mit anschließendem chain tracing

Links ist schematisch eine mehrfache Überlagerung von Signalleitern für den Frequenzbereich der Amidprotonen in einem homonuklearen 2D-Spektrum gezeigt, die durch Aufspaltung entlang der ^{15}N -Dimension in einer ^{15}N -editierten 3D-Aufnahme (mitte) aufgelöst wird; die in den ^1H - ^1H -NOESY-Ebenen liegenden Signalleitern werden streifenförmig extrahiert und mittels chain tracing (gestrichelte Linie) der Aminosäuresequenz entsprechend angeordnet; beim ^1H , ^{15}N -HSQC-Experiment (unten) ist die ^{15}N - mit der ^1H -Frequenz der direkt an Stickstoff gebundenen Protonen korreliert, so dass in dieser 2D-Aufnahme für jede NH-Gruppe ein Signal erscheint.

Vor allem bei ungewöhnlichen Verschiebungen, bei Frequenzdegeneration oder bei Signalüberlappung kann es zu Problemen bei der Zuordnung gerade der Resonanzen der Seitenkettenprotonen kommen. Eine eindeutige Identifizierung der Signale ist dann oftmals nur unter Zuhilfenahme der Informationen aus den homonuklearen 2D-Experimenten, insbesondere der COSY-Spektren, möglich. So wurden für die eindeutige Zuordnung der Resonanzen von GPdom15 und GPdom15kurz sowohl die Informationen aus den ^{15}N -editierten 3D-Aufnahmen als auch die der homonuklearen Spektren genutzt.

3.15.5.2 Analyse der Sekundärstruktur nach Wishart

Die chemischen Verschiebungen von Kernen des Proteinrückgrates weisen bei Aminosäuren mit regulärer Sekundärstruktur im Vergleich zu kurzen, unstrukturierten Peptiden (*random coil*) charakteristische Abweichungen auf. So sind in α -helikalen Bereichen die $H\alpha$ -Protonen zu höherem Feld verschoben, während bei β -Faltblättern eine Tieffeldverschiebung beobachtet wird. Diese Korrelation ermöglicht eine Analyse, bzw. theoretische Vorhersage der Sekundärstruktur für einen bestimmten Proteinabschnitt direkt aus den experimentell bestimmten chemischen Verschiebungen (Wishart *et al.*, 1991; Wishart *et al.*, 1992; Wishart *et al.*, 1995). Hierzu wird zunächst für jede Aminosäure ein sogenannter Verschiebungsindex (CSI; *chemical shift index*) aus der Differenz der beobachteten chemischen Verschiebung (δ_{exp}) und der für die jeweilige Aminosäure typischen Verschiebung in unstrukturierten Peptiden (δ_{rc}) bestimmt ($\Delta\delta = \delta_{\text{exp}} - \delta_{\text{rc}}$). Bei Überschreitung eines bestimmten Schwellenwertes für $\Delta\delta$ ($\pm 0,1$ ppm für $H\alpha$; Wishart *et al.*, 1995) wird ein CSI von +1 bzw. -1, bei Differenzen innerhalb des Toleranzbereiches ein CSI von 0 zugeordnet.

Mindestens vier aufeinander folgende negative CSI-Werte, ohne Unterbrechung durch einen CSI von +1, weisen im Fall der $H\alpha$ -Resonanzen auf eine helikale Anordnung für diese Aminosäuren hin. Für eine β -Faltblattstruktur sollten mindestens drei +1-Werte ohne Einschub eines CSI von -1 nacheinander folgen. Strukturierte Bereiche können dabei einen Anteil von bis zu 30 % mit einem CSI von 0 aufweisen. Das Ende eines Strukturelements zeigt oftmals einen gegensätzlichen CSI-Wert bzw. zwei Nullen (Wishart *et al.*, 1992). So können Strukturelemente mit einer Genauigkeit von etwa 90 % bestimmt werden – eine noch zuverlässigere Aussage ist durch Einbeziehung der $^{13}\text{C}\alpha$ - und ^{13}CO -Resonanzen zu erzielen (Wishart *et al.*, 1994).

3.16 Strukturberechnung

3.16.1 Computer Hard- und Software

Alle Moleküldynamikrechnungen wurden auf einem Sun Ultra Enterprise 450 Server (Sun Microsystems Inc., Palo Alto, CA, USA) mit der NIH-Version 1.2.1 (Schwieters *et al.*, 2003) des Programmpakets XPLOR, Version 3.8.5.1 (Brünger, 1993) durchgeführt. Die graphische Darstellung erfolgte mit den Programmen RasMol V2.6 (Sayle, 1995) und MolMol (Koradi *et al.*, 1996).

3.16.2 Experimentelle Randbedingungen

3.16.2.1 Distanzbeschränkungen aus NOE-Kreuzresonanzen

NOE-Kreuzresonanzen können für Protonen, die nicht weiter als 5 Å voneinander entfernt sind, beobachtet werden (Kumar *et al.*, 1981; Braun *et al.*, 1981), wobei die Intensität des jeweiligen NOE-Signals der inversen sechsten Potenz des Abstandes der entsprechenden Protonen proportional ist (Wüthrich, 1986). Da die Intensitäten aber auch durch weitere Kernspins in der Umgebung (Spindiffusion; Hull & Sykes, 1975) sowie dynamische Effekte beeinflusst werden, verzichtet man meist auf eine direkte Umsetzung der Intensität in eine exakte Abstandsbeschränkung und gibt stattdessen Abstandsintervalle vor.

Vor allem aufgrund von Frequenzdegenerationen ist eine eindeutige Zuordnung aller NOE-Kreuzsignale nicht immer auf Anhieb möglich, weshalb meist auf ein iteratives Verfahren zurückgegriffen wird (Kraulis *et al.*, 1989). Dabei werden NOEs, die eindeutig zugeordnet werden konnten, zur Berechnung einer vorläufigen Strukturschar verwendet. Anhand dieser werden dann alle mehrdeutigen NOEs überprüft und fließen in der nächsten Runde der Strukturberechnung als weitere eindeutige NOEs mit ein, wenn sie einem Protonenpaar zugeordnet werden konnten. Diese iterative Prozedur wird dann solange fortgesetzt, bis keine weitere Zuordnung mehr möglich ist. Der Vergleich der theoretisch zu erwartenden NOEs aus den vorläufigen Strukturen (NOE_{fromPDB} aus Schweimer, 2000) mit den vorhandenen experimentellen Daten ermöglicht dabei ein frühzeitiges Erkennen einer fehlerhaften Zuordnung.

Zur Quantifizierung der NOE-Stärke und somit zur Bestimmung der Abstandsintervalle wurden die Intensitäten der NOE-Kreuzresonanzen der 3D-NOESY-Spektren mit Hilfe von NMRview5.0.4 (Johnson & Blevins, 1994) und die der homonuklearen 2D-NOESY-Aufnahmen mit NDEE-Programmen (Spinup Inc., Dortmund) analysiert. Nach Erfassen von Intensitäten und Frequenzen der Signale wurde mittels am Lehrstuhl entwickelter Programme eine Auswahlliste für die NOE-Zuordnung erstellt und dabei die jeweiligen Intensitätswerte in entsprechende Abstandsbeschränkungen (AssignNOE aus Schweimer, 2000) überführt. Als Orientierung für die Einteilung der NOE-Stärke dienten dabei bereits eindeutig zugeordnete sequentielle NOEs des helikalen Bereichs vom Typ $\text{HN}_{(i)}\text{HN}_{(i+1)}$ und $\text{H}\alpha_{(i)}\text{HN}_{(i+1)}$, da bei α -Helices der Abstand der entsprechenden Wasserstoffatome typischerweise 2,8 Å bzw. 3,5 Å beträgt (Wüthrich, 1986). Ihren Intensitäten entsprechend wurden NOEs als *stark*, *mittel* und *schwach* klassifiziert und den Abstandsintervallen 0 bis 2,7 Å, 0 bis 3,5 Å und 0 bis 5,0 Å zugeordnet (Clore *et al.*, 1987; Varani *et al.*, 1996). Ferner ist die Einteilung der NOEs anhand des Abstandes der zugehörigen Aminosäuren (Position i und j) innerhalb der Primärsequenz

in intraresidual ($i = j$), sequentiell ($|i - j| = 1$), mittelweitreichend (*medium-range*, $1 < |i - j| \leq 5$) und weitreichend (*long-range*, $|i - j| > 5$) üblich (Wüthrich, 1986).

Die Analyse und graphische Darstellung der Auftragung der Sekundärstruktur-bestimmenden interresidualen und mittelweitreichenden NOE-Kreuzresonanzen (Wüthrich, 1986) gegen die Sequenzposition erfolgte mit dem Programm Vince (La Rosa *et al.*, 1996).

3.16.2.2 Einschränkung der Diederwinkel durch 3J -Kopplungskonstanten

Die Größe der vicinalen Kopplungskonstanten $^3J(\text{HN}, \text{H}\alpha)$ zwischen dem HN- und dem H α -Proton korreliert mit dem Torsionswinkel Φ des Proteinrückgrates (Karplus, 1959; Pardi *et al.*, 1984) gemäß Gleichung 3-7 und kann daher zur Beschränkung der Diederwinkel herangezogen werden.

$$^3J(\text{HN}, \text{H}\alpha) = 6,4 \cos^2(\Phi - 60^\circ) - 1,4 \cos(\Phi - 60^\circ) + 1,9 \quad (\text{Gleichung 3-7})$$

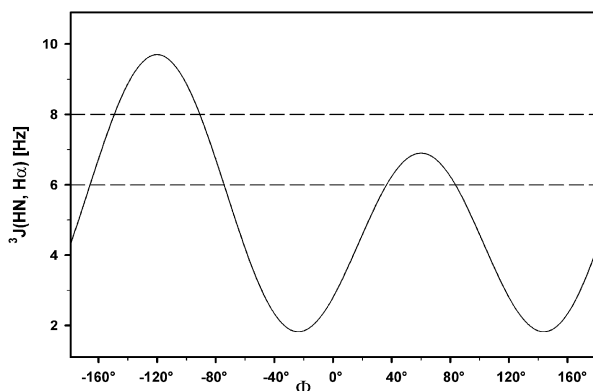


Abb. 3.5: Abhängigkeit der skalaren Kopplungskonstanten $^3J(\text{HN}, \text{H}\alpha)$ vom Torsionswinkel Φ gemäß der Karplus-Beziehung (Gleichung 3-7)

Ausschlussgrenzen von 6 und 8 Hz zur Beschränkung des Winkels Φ sind als gestrichelte Linie dargestellt.

Nachdem diese sogenannte Karplus-Beziehung für bestimmte Kopplungskonstanten verschiedene Torsionswinkel erlaubt (Abb. 3.5), ist eine eindeutige Umsetzung der experimentell bestimmten 3J -Kopplungskonstanten in eine Beschränkung des Diederwinkels Φ (Wüthrich, 1986) nicht immer möglich. Außerdem ist zu beachten, dass sich für Regionen hoher Flexibilität des Proteinrückgrates eine Mittelung der Kopplungskonstanten über Werte verschiedener Konformationen ergibt (Cavanagh *et al.*, 1996). Daher wurden zum einen nur Kopplungskonstanten kleiner 6 Hz, bzw. größer 8 Hz für Winkelbeschränkungen genutzt und zu anderen wurde, ebenso wie bei der Umsetzung der NOE-Stärke in Abstandsklassen (Kap. 3.15.2.1), statt eines exakten Wertes ein Intervall vorgegeben (α -Helix: $\Phi = -60 \pm 20^\circ$; β -Faltblatt: $\Phi = -120 \pm 40^\circ$). Die 3J -Kopplungskonstanten wurden direkt aus dem Verhältnis der Intensitäten von nicht überlagerten Kreuz- und Diagonalsignalen des HNHA-Experiments berechnet (Gleichung 3-8; Vuister & Bax, 1993; Zhang *et al.*, 1997). Hierbei wurde das teilweise unter-

schiedliche Relaxationsverhalten der beiden Kohärenztransferwege, die zu Kreuz- bzw. Diagonalresonanzen führen, wie für Proteine in der Größe von GPdom15, bzw. GPdom15kurz üblich, durch einen Korrekturfaktor von 1,05 ausgeglichen (Vuister & Bax, 1993; Kuboniwa *et al.*, 1994; Dux *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1997).

$$^3J_{\text{HNH}\alpha} = F_c \cdot \frac{1}{2\pi \cdot \delta} \cdot \arctan \cdot \sqrt{-\frac{I_c}{I_d}} \quad (\text{Gleichung 3-8})$$

I_c = Intensität des Kreuzsignals

δ = Länge des Kohärenztransfers von HN zu H α (12,3 ms)

I_d = Intensität des Diagonalsignals

F_c = Korrekturfaktor (1,05)

3.16.2.3 Abstandsbeschränkungen aus Wasserstoffbrücken

Die Rate des chemischen Austausches mit Protonen des Lösungsmittels ist bei Amidprotonen, wenn sie an der Bildung einer Wasserstoffbrückenbindung beteiligt sind, stark vermindert. Da Bereiche mit regulärer Sekundärstruktur durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert werden, können D₂O-Austausch NMR-Experimente (Kap. 3.15.3) Hinweise auf das Vorliegen von Sekundärstrukturelementen liefern (Wüthrich, 1986). Aus der Austauschrate kann außerdem geschlossen werden, wie stark die jeweilige Amidgruppe dem Lösungsmittel exponiert ist. Um aus dem Austauschverhalten Abstandsbeschränkungen ableiten zu können, muss auch der Akzeptor bekannt sein. Da für dessen Identifizierung bereits hinreichend zuverlässige Strukturen nötig sind (Brünger & Nilges, 1993), werden diese Distanzvorgaben erst in der späteren Phase der Strukturrechnung mit einbezogen.

Von Amidprotonen, die mehr als 120 min nach dem Lösen von ¹⁵N markiertem GPdom15 in reinem D₂O noch ein detektierbares Signal im ¹H, ¹⁵N-HSQC Spektrum zeigten (Kap. 3.15.3), wurde eine Einbeziehung in eine Wasserstoffbrückenbindung angenommen. Der jeweilige Akzeptor wurde aus den Strukturen der iterativen Strukturbestimmung identifiziert (XPLOR-Protokoll: h_bond.inp aus Sticht, 1995), wenn bei mehr als 60 % der energieärmsten Strukturen der O...H–N Winkel größer als 120° und der Abstand zwischen Amidproton und Akzeptor-Sauerstoff $d(\text{N–H}\cdots\text{O}) < 2,3 \text{ \AA}$ war. Für jede gefundene Wasserstoffbrücke wurden jeweils die beiden folgenden Distanzbeschränkungen eingeführt: $d(\text{N–H}\cdots\text{O}) < 2,3 \text{ \AA}$ und $d(\text{N}\cdots\text{O}) < 3,3 \text{ \AA}$ (Kraulis *et al.*, 1989). Solche Distanzvorgaben führen in der Regel insbesondere bei regulären Sekundärstrukturelementen zu einer erheblichen Verbesserung der lokalen Geometrie aufgrund der Abstandsbeschränkung zwischen den „schweren“ Atomen des Donors und des Akzeptors.

3.16.3 Berechnung der Strukturen nach dem Prinzip des *simulated annealing*

Ziel der Strukturberechnung ist es, eine Struktur zu finden, die mit den experimentellen Randbedingungen möglichst gut in Einklang steht. Zur Beschreibung dieses Problems dient ein von den atomaren Koordinaten des Moleküls abhängendes Potential, das neben den experimentellen Randbedingungen (E_{exp}) auch Informationen über die chemischen Eigenschaften des Systems (E_{chem}), wie Bindungslängen und -winkel oder Van-der-Waals-Kräfte, berücksichtigt. Der Skalierungsfaktor ω erlaubt eine Gewichtung der beiden Terme, um im Laufe der Strukturberechnung gegebenenfalls ungleichmäßige Änderungen von $\omega \times E_{\text{exp}}$ und E_{chem} ausgleichen zu können (Jack & Levitt, 1978; Clore & Gronenborn, 1989).

$$E_{\text{pot}} = E_{\text{chem}} + \omega E_{\text{exp}} \quad (\text{Gleichung 3-9})$$

Bei der Minimierung dieser Funktion, also der Erfüllung möglichst aller Randbedingungen und chemischen Eigenschaften, wird die Energiehyperfläche des Moleküls abgesucht, wobei das Auffinden des globalen Minimums (= native Struktur; Sippl, 1993), durch die Existenz vieler lokalen Minima (= unterschiedliche Konformationen des Moleküls) erschwert wird (Abb. 3.6). Bei Moleküldynamik-Simulationen nach dem *simulated annealing* Prinzip (Kirkpatrick *et al.*, 1983) sind auf der Suche nach dem globalen Energieminimum mit gewisser Wahrscheinlichkeit auch Schritte mit energetisch ungünstigeren Strukturen erlaubt, wodurch diese lokalen Minima überwunden werden können. Um zunächst auch große Energiebarrieren überschreiten zu können, startet man die Simulation bei hoher Energie, die im Fall des *simulated annealing* Prinzips einer hohen Temperatur entspricht (Kirkpatrick *et al.*, 1983).

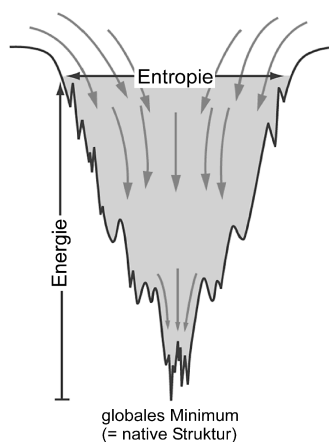


Abb. 3.6: Schematische zweidimensionale Darstellung einer Energiehyperfläche eines Proteins

Die grau hinterlegte Fläche entspricht dem Konformationsraum, der bei hoher Energie eine noch große Entropie aufweist und der im Laufe der Strukturrechnung nach dem globalen Minimum abgesucht wird (grauen Pfeile).

Beim anschließenden langsamen schrittweisen Abkühlen werden gemäß der Boltzmann-Verteilung energetisch günstigere Konformationen mit immer höherer Wahrscheinlichkeit ange-

nommen. Mit mehreren unabhängigen Strukturrechnungen bei zufällig ausgewählten unterschiedlichen Anfangsbedingungen kann überprüft werden, ob bei der Lösung des komplexen Optimierungsproblems für die vorgegebenen Einschränkungen ein eindeutiges globales Minimum erhalten wird, wofür sich ein dreiphasiges *simulated annealing* bewährt hat (Nilges, 1996; Nilges *et al.*, 1988 a, b).

3.16.3.1 Berechnung einer geometrisch korrekten Startstruktur

Zum Generieren der Startstruktur (z.B. von dom15kurz) mit korrekter lokaler Geometrie wurde mit dem XPLOR-Standardprotokoll *generate_structure.inp* (Anhang, Kap. 10.4.1) zunächst die jeweilige Strukturdatei (*protein structure file*), z.B. *dom15kurz.psf*, erzeugt, die neben der Anordnung der Atome in den einzelnen Aminosäuren auch deren Masse und Ladung, sowie Bindungswinkel, Improperwinkel und die Sequenz des Proteins enthalten. Die Disulfidbrücken (Cys5-Cys40, Cys18-Cys37, Cys26-Cys58) wurden hierbei als kovalente Bindungen vorgegeben, nachdem das Vorliegen dieses Verbrückungsmusters experimentell bestätigt werden konnte (Kap. 4.6.5). Um den Einfluss dieser Vorgabe überprüfen zu können, wurden auch Strukturdateien ohne vorgegebene Disulfidverbrückung erstellt und Vergleichsstrukturen bei Verwendung ansonsten identischer Randbedingungen berechnet. Nach Erstellung der Strukturdatei wurden mit Hilfe des Protokolls *generate_template.inp* (Anhang, Kap. 10.4.2) die zugehörigen Koordinatendateien (ohne Disulfidbrücken), z.B. *dom15kurz_template.pdb*, im *protein-data-bank*-Format erstellt, wobei für alle Proline auch bei allen weiteren Strukturrechnungen die experimentell verifizierte (Kap. 4.6.4) *trans*-Konformation fest vorgegeben wurde.

3.16.3.2 *simulated annealing*

Ausgehend von der Startstruktur wurden zunächst 60, dann 100 und zuletzt 200 Proteinstrukturen mit Hilfe eines modifizierten *simulated annealing* Protokolls (z.B. *sa_dom15.inp*, Anhang, Kap. 10.4.3) berechnet, das ein *soft-square-well*-Potential für die NOE-Abstandsbeschränkungen (Kap. 3.16.2.1) und für die Beschränkung der dihedralen Winkel aus Kopplungskonstanten (Kap. 3.16.2.2) ein harmonisches Potential verwendet. Außerdem greift es auf die auf dem CHARMM-Kraftfeld (Brooks *et al.*, 1983) basierende Parameterdatei *topallhdg.pro* mit Informationen zu Bindungslängen, Bindungswinkel, Van-der-Waals-Radien und skalierbaren Kraftkonstanten für alle Potentialterme zurück.

Nach Randomisierung der Startstrukturen mit zufälligen Φ - und Ψ -Winkeln und kurzer Ener-

gieminimierung (Powell, 1977) diente die erste 180 (dom15kurz), bzw. 240 ps (dom15) lange Hochtemperaturphase ($T = 2000$ K) zum Absuchen des Konformationsraumes, wobei nicht-kovalente Wechselwirkungen nur für die $C\alpha$ -Atome und ein Kohlenstoffatom für jede Seitenkette mit einem Van-der-Waal-Radius von $2,25 \text{ \AA}$ berücksichtigt wurden. In der zweiten Phase erfolgte in 20 Schritten eine langsame Abkühlung (180 bzw. 240 ps) auf $T = 1000$ K. Hierbei wurden nicht-kovalente Wechselwirkungen zwischen allen Atomen berücksichtigt und die einzelnen Kraftkonstanten sukzessive auf ihren endgültigen Wert erhöht. Bei der Reduzierung der Temperatur auf $T = 100$ K in der dritten 90 bzw. 120 ps langen Phase, wurden die Parameter der Potentialfunktion E_{pot} nicht mehr verändert.

Um möglichst das absolute Minimum der Energiefunktion zu erreichen, wurden abschließend 200 Energieminimierungsschritte (nach Powell, 1977) mit und 1000 weitere Schritte ohne Datenbank-Potential gerechnet. Der Datenbank-Term, dessen Energiefunktion die Häufigkeit einer bestimmten Konformation in hochaufgelösten Kristallstrukturen widerspiegelt, minimiert unwahrscheinliche Konformationen des Proteinrückgrates und der Seitenketten (Clore & Gronenborn, 1998; Kuszewski & Clore, 2000; Kuszewski *et al.*, 1996; Neudecker *et al.*, 2001) und dient zur Stabilisierung von durch experimentelle Randbedingungen schlecht definierten Bereichen. Zur Überprüfung des Einflusses des Datenbank-Potentials wurden zusätzlich auch Vergleichsstrukturen ohne Einbeziehung dieses Terms unter ansonsten gleichen Randbedingungen berechnet.

Die drei vorhandenen Disulfidbrücken (Cys5-Cys40, Cys18-Cys37, Cys26-Cys58) wurden bei den Strukturberechnungen als jeweils eine Distanzbeschränkung mit einem Abstand der Schwefelatome (d_{ss}) von $2,02 \pm 0,1 \text{ \AA}$ vorgegeben. Zur Überprüfung, ob diese Vorgaben das Ergebnis der Strukturberechnungen beeinflussen, wurden auch Testrechnungen ohne diese Distanzbeschränkungen durchgeführt (Kap. 3.16.3.1). Stereospezifisch zugeordneten Resonanzen wurde durch das *floating chirality assignment* prochiraler Gruppen (Holak *et al.*, 1989) ein Positionswechsel am Chiralitätszentrum erlaubt, falls dadurch die NOE-Distanzbeschränkungen besser erfüllt wurden.

3.16.3.3 Strukturanalyse

Die Schar (mit gleichen Randbedingungen, aber unterschiedlichen Startgeometrien) berechneter Strukturen (Kap. 3.16.3.2) wurde mit Hilfe der am Lehrstuhl entwickelten Perl-Skripten `XPLOR_rank_2.pl` und `XPLOR_rank3.pl` nach Gesamtenergie geordnet und konvergierende Strukturen mit `noe_violations.pl` auf Verletzungen der NOE-Abstandsbeschränkungen

gen von mehr als 0,1 Å bzw. mit `dih_violations.pl` auf Abweichungen von den dihedralen Winkel-Vorgaben von mehr als 0,001° überprüft.

RMSD-Werte der berechneten Strukturenscharen wurden mittels XPLOR und dem entsprechend modifizierten Protokoll `ave_dom15.inp` (Anhang, Kap. 10.4.4; aus Sticht, 1995) gegenüber einer dabei gleichzeitig erstellten Durchschnittsstruktur ermittelt, während der jeweilige RMSD-Wert pro Aminosäurerest mit der entsprechend angepassten Routine `ave_plot_dom15.inp` (Anhang, Kap. 10.4.5; aus Sticht, 1995) berechnet wurde.

Die Sekundärstrukturelemente und die Torsionswinkel wurden mit dem Programmpaket PROCHECK (Version 3.3; Laskowski *et al.*, 1993, 1996) analysiert. Ausgehend von einer Schar von Strukturen können Φ/Ψ -Winkelpaare für das gesamte Protein oder einzelne Aminosäuren als Ramachandran-Plot (Ramachandran *et al.*, 1963) dargestellt werden. Zur Überprüfung der Winkel Φ und Ψ sowie des RMSD-Wertes wurde auch das Programm MOLMOL (Version 2K.1; Koradi *et al.*, 1996) genutzt. Für eine umfassende Evaluierung der Strukturen wurde WHAT IF (Vriend, 1990) und zur Klassifizierung von Sekundärstrukturelementen PROMOTIF (Hutchinson & Thornton, 1996) verwendet.

3.17 Komparative Molekülmodellierung

Zur Molekülmodellierung wurden die Proteinstrukturen mit Hilfe des Programmes SYBYL Version 6.5 (Tripos, St.Louis, USA) entsprechend modifiziert und die modellierte Struktur abschließend energieminimiert (Tripos-Kraftfeld).

4 Experimente und Ergebnisse

4.1 Klonierungen

Für die strukturelle Charakterisierung eines Proteins mittels NMR-Spektroskopie sind Proteinmengen im Milligramm-Bereich nötig, die meist rekombinant mit Hilfe von Bakterien hergestellt werden. Voraussetzung für die Gewinnung ausreichender Mengen reinen Proteins und gegebenenfalls auch für eine Markierung mit NMR-aktiven Isotopen ist daher die Etablierung eines effizienten Expressionssystems und eines geeigneten Reinigungsprotokolls.

Die Expression von disulfidverbrückten Proteinen mit Thioredoxin als Fusionspartner hat sich in Thioredoxin-Reduktase negativen (*trxB*⁻) *E. coli*-Stämmen als vorteilhaft erwiesen (Lauber *et al.*, 2001; LaVallie *et al.*, 1993; Stewart *et al.*, 1998), weshalb eine Kombination aus den *E. coli*-Stämmen AD494(DE3) bzw. Origami(DE3) mit Thioredoxin-Reduktase-Defizienz (*trxB*⁻; Derman *et al.*, 1993; Prinz *et al.*, 1997) und dem Vektor pET-32a für die LEKTI-Domäne 15-Varianten am besten geeignet erschien. Zur Ermittlung einer geeigneten Proteinase zur Abspaltung des Fusionsanhangs vom Zielprotein wurden Konstrukte mit einer Schnittstelle für die Proteinasen Enterokinase (EK) bzw. PreScission (PreS) hergestellt. Beide Proteinasen zeichnen sich durch eine hohe Spezifität aus, und ihre potentiellen Erkennungssequenzen treten innerhalb der Primärsequenzen der Zielproteine nicht auf. Weitere Proteinasen wie z.B. Thrombin wurden auf Grund zahlreicher potentieller primärer und sekundärer Schnittstellen in den Aminosäuresequenzen der Zielproteine nicht getestet. Die Bezeichnung der Konstrukte erfolgte dabei in Anlehnung an die vorhandene Spaltstelle und die jeweilige Domäne 15-Variante.

4.1.1 Konstruktion der Plasmide pET-32a-EK-*dom15* und pET-32a-PreS-*dom15*

Zu Beginn dieser Arbeit lag das Plasmid pET-21a-HisVak15 vor (Dr. Peter Kreutzmann; IPF PharmaCeuticals, Hannover; Anhang, Kap. 10.1). Die korrespondierende Aminosäuresequenz des inserierten Gens entspricht einem in dieser Arbeit als (LEKTI-)Domäne 15 (*dom15*) bezeichneten und sich von D989 bis E1064 erstreckenden Sequenzbereich des LEKTI-Vorläufer-Proteins aus *Homo sapiens* (Swiss-Prot-Datenbank: Q9NQ38; Boeckmann *et al.*, 2003; TrEMBL-Datenbank: AJ228139; Apweiler *et al.*, 2004).

Durch PCR (Kap. 3.6.4) mit den Linker-Primern *dom15_3'* und *PreS_dom15_5'* bzw. *EK_dom15_5'* (Kap. 3.3) und dem Plasmid pET-21a-HisVak15 (Kap. 3.2.3) als Matrize wurde das Gen für die Domäne 15 am 3'-Ende mit einem Stop-Codon sowie einer *Bam* HI-

Schnittstelle und am 5'-Ende mit der entsprechenden Sequenz für die Restriktionsenzyme *Xba*I und *Kpn*I sowie mit einer Schnittstelle für die Proteinasen PreScission (PreS) bzw. Enterokinase (EK) kodierenden Erkennungsequenz versehen. Die entsprechenden PCR-Fragmente wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese (1,5 % Agarose, Kap. 3.11.1) separiert sowie nach Extraktion (Kap. 3.6.2) in Y+/Tango™-Puffer aufgenommen und mit *Bam* HI und *Xba*I gleichzeitig restringiert (Kap. 3.6.3). Nach Enzymabtrennung und Pufferwechsel wurde jedes Fragment in ebenfalls mit *Bam* HI und *Xba*I geschnittenen und dephosphorylierten (Kap. 3.6.3) pBlueskript II KS ligiert und die Vektor-DNA nach Butanolfällung (Kap. 3.6.2) mittels Elektroporation (Kap. 3.7.1) in kompetente *E. coli* Top10-Zellen gebracht. Mehrere positive Transformanten wurden per Kolonie-PCR (Kap. 3.6.4) auf erfolgreiche Insertion des PreS- bzw. EK-*dom15*-Gens überprüft, wobei die zu dem 5'- bzw. 3'-Ende des Inserts komplementären Oligonukleotide *dom15_3'* und *PreS_dom15_5'* bzw. *EK_dom15_5'* als Primer dienten (Kap. 3.3; Tab. 3.3).

Einige der Kolonien mit positivem PCR-Screening-Ergebnis wurden kultiviert (Kap. 3.7.2), die jeweilige Plasmid-DNA isoliert (Kap. 3.6.1) und die korrekte Nukleotidsequenz durch Sequenzierung bestätigt (Kap. 3.6.5; Anhang, Kap. 10.1.2 und 10.1.3).

Zur Überführung des PreS- bzw. EK-*dom15*-Gens in den Expressionsvektor pET-32a (Kap. 3.2.2) wurde das entsprechende pBlueskript II KS-Konstrukt mit *Kpn*I und nach Enzymabtrennung und Pufferwechsel mit *Bam* HI umgesetzt. Nach Agarose-Gelelektrophorese (1,5 % Agarose, Kap. 3.11.1) wurde das jeweilige *dom15*-Gen-Fragment extrahiert (Kap. 3.6.2). Die Restriktion des Vektors pET-32a erfolgte ebenfalls mit *Kpn*I und *Bam* HI (Kap. 3.6.3). Nach Entfernen der Restriktionsendonukleasen sowie Pufferwechsel (Kap. 3.6.2) wurde mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert (Kap. 3.6.3), um die Religation der Vektor-DNA weitgehend zu verhindern. Nach erneutem Pufferwechsel wurde der so doppelt restringierte Vektor mit der PreS- bzw. EK-*dom15*-DNA ligiert (Kap. 3.6.3) und die ligierte DNA nach Butanolfällung (Kap. 3.6.2) per Elektroporation in kompetente *E. coli* Top10-Zellen eingebracht (Kap. 3.7.1).

Die Selektion von Bakterienzellen mit Plasmid erfolgte auch hier durch Ausplattieren auf Ampicillin-haltigen Agarplatten (Kap. 3.7.2). Zur Identifizierung von positiven Transformanten wurde eine Kolonie-PCR (Kap. 3.6.4) mit den Oligonukleotiden *trx-forward* und *T7-Terminator* (Kap. 3.3) als Primer durchgeführt, die etwa 150 bp stromaufwärts bzw. stromabwärts bezüglich der MCS (*multiple cloning site*) anlagern. Von Klonen mit gewünschter Am-

plifikatlänge (ca. 660 bp) wurde die Plasmid-DNA isoliert und mit n-Butanol gefällt (Kap. 3.6.2). Die auf diese Weise in ausreichenden Mengen gewonnenen pET-32a-Konstrukte pET-32a-EK-*dom15* und pET-32a-PreS-*dom15* wurden anschließend per Elektroporation (Kap. 3.7.1) in die entsprechenden Expressionsstämme gebracht (Kap. 3.1.2).

4.1.2 Konstruktion der Plasmide **pET-32a-PreS-*dom15kurz*** und **pET-32a-PreS-*dom15ldti***

Zur Konstruktion des Plasmides pET-32a-PreS-*dom15kurz*, welches ein verkürztes, nur noch für den LEKTI-Bereich D989 bis E1047 (Kap. 4.1.1) kodierendes *dom15*-Gen (*dom15kurz*) enthält, wurde eine Linker-PCR (Kap. 3.6.4) mit den Oligonukleotidprimern *PreS_dom15_5'* und *dom15_kurz_C_3'* und dem Vektor pET-32a-PreS-*dom15* (Kap. 3.2) durchgeführt. Auf die gleiche Weise wurde unter Verwendung der Oligonukleotidprimer *dom15LDTI_5'* und *dom15kurz_C_3'* der Vektor pET-32a-PreS-*dom15ldti* konstruiert. Das darin enthaltene und als *dom15ldti* bezeichnete Gen kodiert für eine Deletionsmutante von *dom15kurz*, bei der der gesamte Bereich zwischen den ersten beiden Cysteinen (K994 - L1005) durch ein Alanin substituiert ist.

Beide PCR-Ansätze wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese (1,5 % Agarose; Kap. 3.11.1) aufgetrennt und die PCR-Fragmente mit dem *dom15kurz*- bzw. *dom15ldti*-Gen extrahiert (Kap. 3.6.2). Nach Restriktion mit *Kpn*I und *Bam* HI wurden die Gene jeweils in ebenso doppelt verdauten, dephosphorylierten pET-32a ligiert (Kap. 3.6.3). Die ligierte DNA wurde nach Butanolfällung (Kap. 3.6.2) durch Elektroporation in kompetente *E. coli* Origami(DE3)-Zellen transformiert (Kap. 3.7.1), die dann auf Agarplatten mit Ampicillin (100 µg/ml), Kanamycin (15 µg/ml) und Tetracyclin (12,5 µg/ml) ausplattiert wurden. Mittels anschließender Kolonie-PCR (Oligonukleotide: *trx-forward* und *T7-Terminator*) wurden positive Transformanten identifiziert (Kap. 3.6.4), von diesen Dauerkulturen angelegt (Kap. 3.7.3) sowie die Plasmide dieser Klone isoliert (Kap. 3.6.1).

Zur Sequenzierung wurde das *dom15kurz*- bzw. *dom15ldti*-Gen in pBlueskript II KS überführt. Nach Bestätigung der korrekten Sequenz (Anhang, Kap. 10.1.4 und 10.1.5) wurden die *E. coli* Origami(DE3)-Klone mit den entsprechenden pET32a-Konstrukten für Expressionsversuche (Kap. 3.7.3) eingesetzt.

Von den vier pET-32a-Konstrukten, pET-32a-EK-*dom15*, pET-32a-PreS-*dom15*, pET-32a-PreS-*dom15kurz* und pET-32a-PreS-*dom15ldti*, wurde eine Expression der jeweiligen *dom15*-Varianten als Fusionsprotein erwartet, wobei der NH₂-terminale Fusionspartner (Trx-tag) aus

einem 109 Aminosäuren großen Thioredoxin-Anhang (*trx*), einem 44 Aminosäuren langen Linker-Bereich mit dem sechs Histidinreste umfassenden Reinigungsanhang (*His₆-tag*) sowie einer Erkennungssequenz von acht Aminosäuren für die PreScission (LEVLFQ↓GP), bzw. von fünf Aminosäuren für die Enterokinase (DDDDK↓) bestehen sollte (Abb. 4.1).

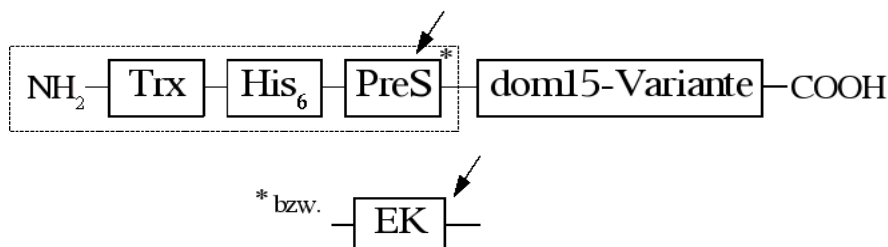


Abb. 4.1: Schematische Darstellung der erwarteten Expressionsprodukte

Schematischer Aufbau der Trx-dom15-Fusionsproteine, die bei Expression der pET32a-Konstrukte zu erwarten sind; Spaltstelle ist markiert (Pfeil).

4.2 Expression und Reinigung der LEKTI-Domäne 15

4.2.1 Expression von Trx-EK-dom15 und Trx-PreS-dom15 in *E. coli* AD494(DE3) und *E. coli* Origami(DE3)

Nach Transformation von *E. coli* AD494(DE3) bzw. Origami(DE3) mit den Plasmiden pET-32a-EK-*dom15* und pET-32a-PreS-*dom15* (Kap. 3.7.1) wurde die jeweilige Expressionsrate der entsprechenden Fusionsproteine Trx-EK-dom15 und Trx-PreS-dom15 in Induktionsversuchen getestet.

Hierzu wurden jeweils 50 ml Bakterienkultur (LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 15 µg/ml Kanamycin; für Origami zusätzlich mit 12,5 µg/ml Tetracyclin) bei einer OD₆₀₀ von 0,8 durch IPTG-Zugabe (Endkonzentration: 1 mM) bei 37 °C induziert (Kap. 3.7.3). Die Expressionsrate wurde mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Kap. 3.11.2) von Kulturproben, die vor und stündlich nach Induktion entnommen wurden, analysiert.

Wie aus Abb. 4.2 hervorgeht, konnte mit beiden *E. coli*-Stämmen eine effiziente Expression von Trx-EK-dom15 und Trx-PreS-dom15 erreicht werden. Für beide Fusionsproteine, die sich nur hinsichtlich der Proteinase-Erkennungssequenz unterscheiden und mit 25,8 kDa (PreS) bzw. 25,5 kDa (EK) eine nahezu identische theoretische molekulare Masse haben, zeigte sich ein apparentes Molekulargewicht von jeweils etwa 29 kDa. Durch Variieren von Temperatur und/bzw. oder Induktionsdauer war nach gelektrophoretischer Analyse keine stärkere Expressionsrate feststellbar (Daten nicht gezeigt), so dass alle weiteren Induktionen zur Gewinnung der Fusionsproteine über eine Dauer von 3 h bei 37 °C durchgeführt wurden. Für *E. coli* Ori-

gami(DE3) wurde dabei stets ein rund 15 % höheres Nasszellgewicht gegenüber *E. coli* AD494(DE3) festgestellt.

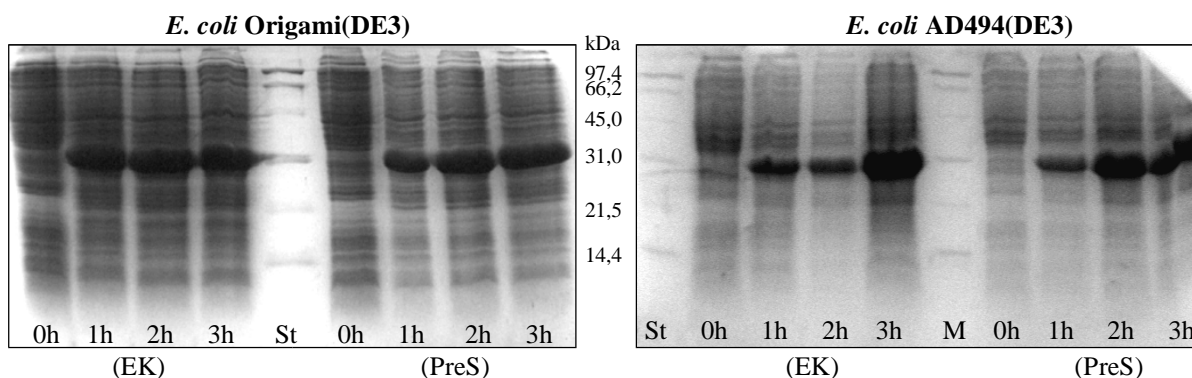


Abb. 4.2: Vergleich der Expressionsraten von Trx-EK-dom15 (EK) und Trx-PreS-dom15 (PreS) in *E. coli* Origami(DE3) und AD494(DE3)

Mit Coomassie gefärbte 19 %ige SDS-Polyacrylamidgele mit Kulturproben jeweils vor (0 h) und 1 bis 3 h nach Induktion mit IPTG bei 37 °C; St: *low range*-Proteinstandard.

4.2.2 Zellaufschluss und Reinigung der Fusionsproteine Trx-EK-dom15 und Trx-PreS-dom15

Nach Zellaufschluss (Kap. 3.7.4) durch Lysozym- und Ultraschallbehandlung und anschließender Ultrazentrifugation (45 min, 4 °C, 40000 rpm; Kap. 3.7.4.1) lagen sowohl Trx-EK-dom15 als auch Trx-PreS-dom15, unabhängig vom verwendeten *E. coli*-Stamm, nahezu vollständig im Überstand gelöst vor. Abb. 4.3 a gibt exemplarisch die elektrophoretische Analyse des Aufschlusses von Origami(DE3)-Zellen der PreScission-Variante wieder.

Beide Fusionsproteine wurden mittels auf Co^{2+} -Ionen basierender Metallionen-Affinitätschromatographie gereinigt (Abb. 4. 3 c; Kap. 3.7.4.2; Porath, 1992). Die Analyse der Fraktionen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ergab (Abb. 4.3 b), dass das Fusionsprotein durch Elution bei einer Kompetitor-Konzentration von 200 mM meist nahezu rein erhalten werden konnte, wobei für die Fraktionen des Auftrags- (Durchbruch) bzw. Waschschrates keine dem Fusionsprotein entsprechende Proteinbande (apparentes Molekulargewicht etwa 29 kDa) erkennbar war. Die gelegentlich, insbesondere bei Kultivierung in Minimalmedium, feststellbaren geringen Verunreinigungen (apparentes Molekulargewicht etwa 15, 18 und 20 kDa) können auf Abbruchprodukte zurückgeführt werden (Abb. 4.3 b), wobei deren Anteil nicht reproduzierbar beeinflussbar war und bei den weiteren Reinigungsschritten abgetrennt werden konnte (Kap. 3.7.5.3; 3.7.5.4).

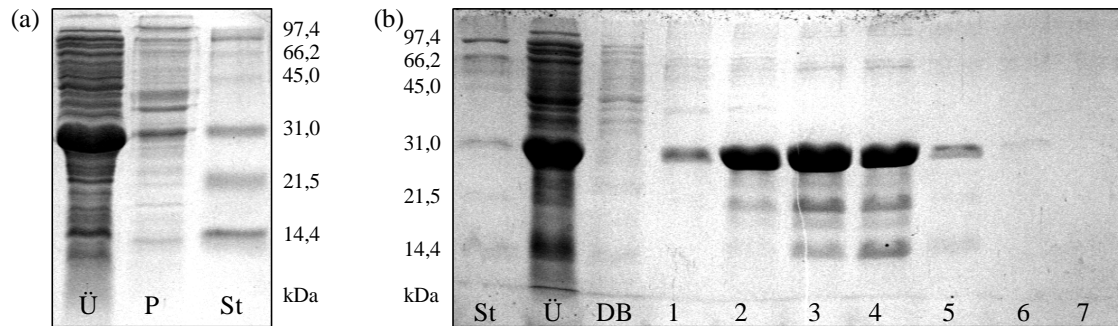


Abb. 4.3: Elektrophoretische Analyse des Zellaufschlusses von *E. coli* Origami (DE3) (a) und einer Reinigung des Fusionsproteins Trx-PreS-dom15 mittels Co^{2+} -Ionen-Affinitätschromatographie (b) sowie zugehöriges Chromatogramm (c)
Coomassie-gefärbte 19 %ige SDS-Polyacrylamidgele mit Proben des Zellaufschlusses und der Affinitätschromatographie sowie zugehöriges Elutionsprofil der Trx-PreS-dom15-Reinigung; Ü: Überstand nach Ultrazentrifugation; P: Pellet (Sediment nach Ultrazentrifugation); DB: Durchbruch (nach Auftragung des Rohextraktes und Waschschritt); 1-5: Trx-PreS-dom15-haltige Fraktionen; 6-7: Regeneration der Säule; St: *low range*-Proteinstandard.

4.2.3 Spaltung der Fusionsproteine Trx-EK-dom15 und Trx-PreS-dom15

Nach Vereinigung und mehrmaliger Dialyse der Fusionsprotein enthaltenden Fraktionen gegen Spaltpuffer sollte der Fusionspartner durch Umsetzung mit der entsprechenden Proteinase abgespalten werden. Hierfür sollte die Eignung der kommerziell erhältlichen Proteinasen Enterokinase (EK) oder PreScission (PreS) festgestellt werden. Während die Enterokinase direkt nach der Erkennungssequenz (DDDDK↓) schneidet, resultiert bei der Spaltung mit PreScission (LEVLFQ↓GP) ein artifizieller Überhang am NH_2 -Terminus von zwei Aminosäuren (Glycin, Prolin). Die zusätzlichen Aminosäuren werden bei der Bezeichnung der jeweiligen Proteine durch Voranstellen der Buchstaben „GP“ berücksichtigt.

Die Spaltung von Trx-EK-dom15 mit Enterokinase erfolgte entsprechend den Herstellerangaben (in 50 mM Tris/HCl, 50 mM NaCl, 2 mM CaCl_2 , pH 7,4), während bei der Umsetzung (in 50 mM Tris/HCl, 50 mM NaCl, pH 7,4) von Trx-PreS-dom15 mit PreScission auf den vom Hersteller empfohlenen Zusatz von DTT und EDTA verzichtet wurde. Damit sollte eine mögliche Reduktion der Disulfidbrücken sowie die Komplexbildung und Auswaschung der Co^{2+} -

Ionen im nachfolgenden Chromatographieschritt verhindert werden.

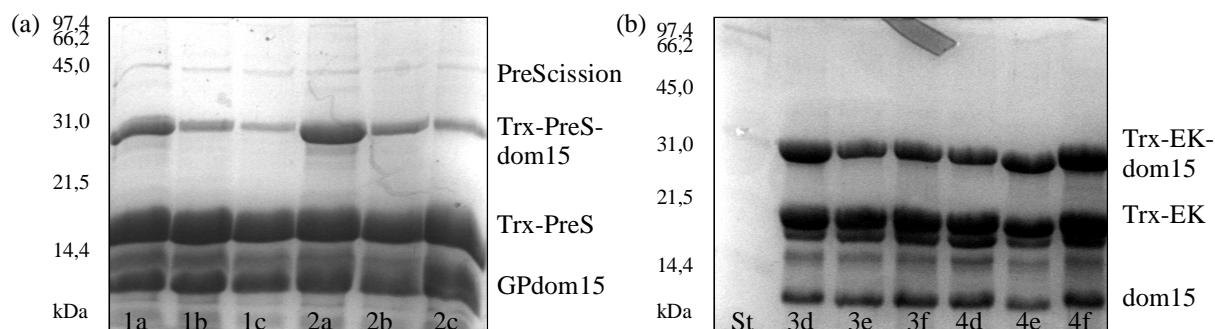


Abb. 4.4: Elektrophoretische Analyse der Spaltprodukte von mit PreScission (a) bzw. Enterokinase (b) umgesetzten Trx-dom15-Fusionsprotein

Mit Coomassie gefärbte 19 %ige SDS-Polyacrylamidgele mit Proben, die während der Spaltung entnommen wurden; PreScission-Konzentration 1: 0,6 U/100 µg und 2: 0,4 U/100 µg; a: 30 min; b: 75 min; c: 120 min; Enterokinase-Konzentration 3: 2 U/100 µg und 4: 5 U/100 µg; d: 16 h; e: 20 h; f: 25 h; St: *low range*-Proteinstandard.

Wie die Analyse von Spaltansätzen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ergab (Abb. 4.4 a), war mit PreScission (0,6 U/100 µg; molekulare Masse: 46 kDa) bereits nach 120 min nahezu sämtliches Fusionsprotein gespalten. Mit Enterokinase (molekulare Masse: 26 kDa) hingegen war auch mit der 2,5-fachen Menge an empfohlener Enzymkonzentration (2 U/100 µg) auch bei verlängerter Spaltdauer (25 h statt 16 h) keine vollständige Spaltung des Fusionsproteins zu erzielen. Zur Abspaltung des Fusionanhangs wurde daher im weiteren Verlauf trotz der dadurch resultierenden zusätzlichen aminoterminalen Reste (Glycin und Prolin) die PreScission eingesetzt. Außerdem wurde im weiteren Verlauf für den Zellaufschluss sowie die Affinitätschromatographieschritte Phosphat-Puffer statt Tris-Puffer ohne Beeinträchtigung der Ausbeuten verwendet, da die Spaltung mit PreScission auch in Phosphat-Puffer (50 mM Natrium-Phosphat, 300 mM NaCl, pH 8,0) erfolgen kann (Daten nicht gezeigt) und Tris (α,α,α -Tris-(hydroxymethyl)-methylamin) schwach an Co^{2+} -Ionen koordiniert und so die Bindungskapazität des verwendeten TALONTM-Säulenmaterials herabsetzt.

4.2.4 Trennung von Fusionsanhang und GPdom15

Zur Abtrennung des Fusionspartners nach Spaltung bzw. von eventuell ungespaltenem Fusionsprotein wurde ein erneuter Metallionen-Affinitätschromatographie-Schritt genutzt.

Die Spaltprodukte des PreScission-Ansatzes (Kap. 4.2.3) ließen sich auf diese Weise (Kap. 3.7.4.2) sehr gut voneinander trennen, wie die Analyse der Zielprotein-haltigen Fraktionen (Durchbruch) mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ergab (Abb. 4.5). Auch eventuell noch vorhandene Abbruchprodukte, wie sie bei der Reinigung des Fusionsproteins gelegent-

lich mit isoliert wurden (Kap. 4.3.1, Abb. 4.3 b), wurden mit diesem Schritt nahezu vollständig vom Zielprotein separiert.

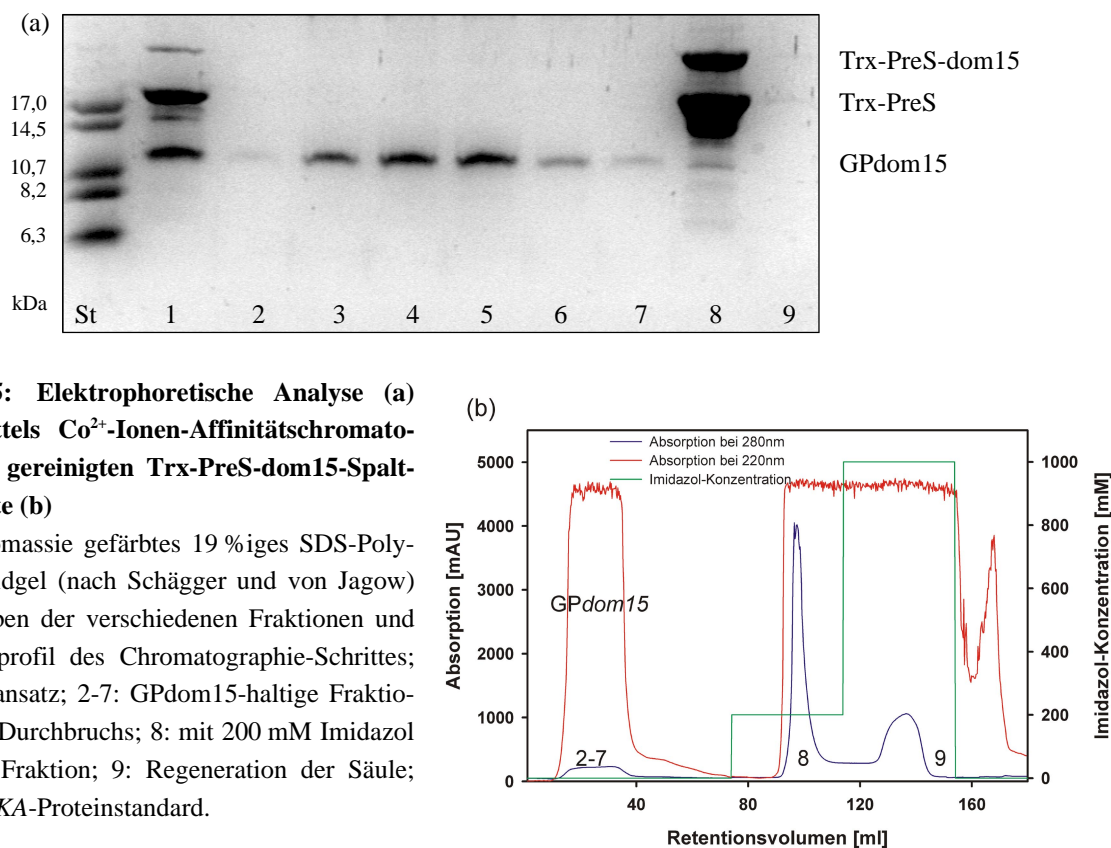


Abb. 4.5: Elektrophoretische Analyse (a) der mittels Co^{2+} -Ionen-Affinitätschromatographie gereinigten Trx-PreS-dom15-Spaltprodukte (b)

Mit Coomassie gefärbtes 19 %iges SDS-Polyacrylamidgel (nach Schagger und von Jagow) mit Proben der verschiedenen Fraktionen und Elutionsprofil des Chromatographie-Schrittes; 1: Spaltansatz; 2-7: GPdom15-haltige Fraktionen des Durchbruchs; 8: mit 200 mM Imidazol eluierte Fraktion; 9: Regeneration der Säule; St: FLUKA-Proteinstandard.

Nach Vereinigung und Dialyse der GPdom15-haltigen Fraktionen wurde zur Abtrennung der Proteinase (molekulare Masse: 46 kDa) und eventuell noch anderen vorhandenen Verunreinigungen eine Größenausschluss- (Kap. 3.7.5.3) bzw. eine Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC; Kap. 3.7.5.4) durchgeführt.

Das Elutionsprofil des Größenausschlusschromatographieschrittes (Abb. 4.6 a) zeigte neben einem Hauptpeak einen geringen Proteinanteil mit deutlich unterschiedlichem Retentionsverhalten, für den im Schagger-SDS-Polyacrylamidgel bei Coomassie-Färbung (Kap. 3.11.2) nur sehr schwachen Banden bei uneinheitlichem Molekulargewicht detektiert wurde (Daten nicht gezeigt). Für die Fraktionen des Hauptpeaks hingegen wurde nur eine Bande mit bereits in Abb. 4.5 gezeigtem Laufverhalten beobachtet (Daten nicht gezeigt). Die Kontrolle der entsprechend vereinigten Fraktionen des Hauptpeaks mittels analytischer RP-HPLC (Kap. 3.7.5.4) bestätigte eine hohe Reinheit (Abb. 4.6 b). Die GPdom15-haltigen Fraktionen wurden schließlich mehrfach gegen Wasser dialysiert und lyophilisiert. Das auf diese Weise gewonnene GPdom15-Protein wurde für weitere analytische Methoden wie Massenspektrometrie

und aminoterminaler Sequenzierung (Kap. 4.4.1) eingesetzt, sowie mittels CD- und NMR-Spektroskopie charakterisiert (Kap. 4.4.2, 4.6).

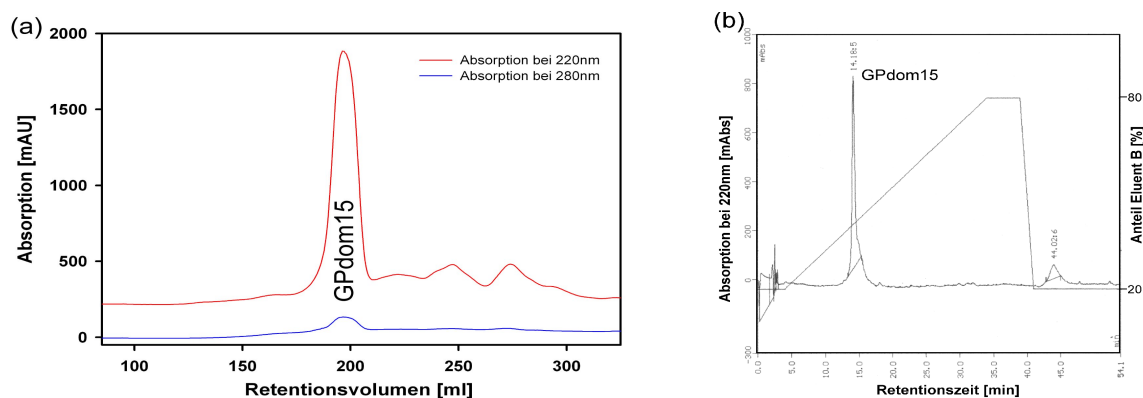


Abb. 4.6: Kontrolle der durch Größenausschluss-Chromatographie gereinigten GPdom15-Fractionen (a) mittels analytischer RP-HPLC (b)

Verlauf der Gelfiltration (a) und Chromatogramm des analytischen RP-HPLC-Laufes (konstanter Gradient in 30 min 20-80 % Anteil Eluent B; vgl. Kap. 3.7.5.4) zur Kontrolle der Reinheit der vereinigten GPdom15-haltigen Fractionen (b).

Nachdem die Authentizität der Faltung von GPdom15, das auf diese Weise unter nicht denaturierenden Bedingungen gewonnen wurde, und RP-HPLC-gereinigtem GPdom15 anhand von 1D- ^1H -NMR-Spektren bestätigt werden konnte (Daten nicht gezeigt, vgl. Abb. 4.8, Kap. 4.3), wurde statt der Größenausschluss- eine Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie als abschließender Reinigungsschritt eingesetzt, die eine effizientere Reinigung bei gleichem Ergebnis (Reinheit) erlaubte.

4.3 Expression und Reinigung der LEKTI-Domäne 15-Varianten dom15kurz und dom15ldti

Für die Expression und Reinigung der LEKTI-Domäne 15-Varianten dom15kurz und dom15ldti wurden im Wesentlichen die Bedingungen für die Gewinnung von dom15 übernommen (Kap. 4.2).

So wurden zur Expression der Fusionsproteine Trx-PreS-dom15kurz und Trx-PreS-dom15ldti (theoretisches Molekulargewicht 24,1 kDa, bzw. 22,7 kDa) die entsprechenden Vektorkonstrukte pET-32a-PreS-dom15kurz und pET-32a-PreS-dom15ldti in *E. coli* Origami(DE3)-Zellen eingebracht (Kap. 3.7.1) und diese ebenfalls 3 h lang bei 37 °C induziert. Erwartungsgemäß konnte eine ähnlich starke Expressionsrate wie für Trx-PreS-dom15 (Kap. 4.2.1) erzielt werden (Abb. 4.7).

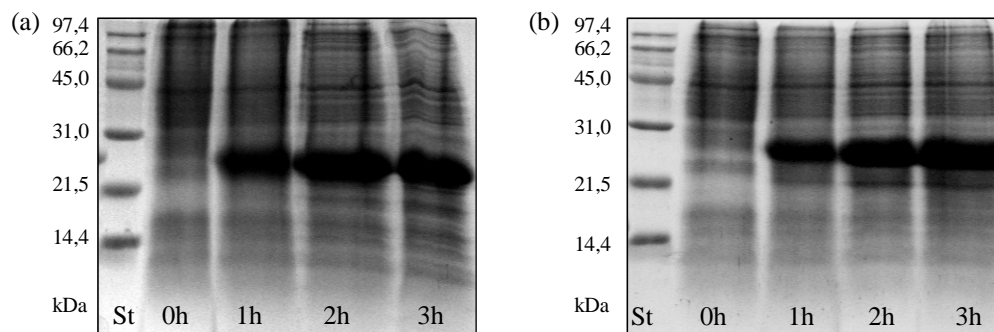


Abb. 4.7: Elektrophoretische Analyse der Expressionsraten von Trx-PreS-dom15ldti (a) und Trx-PreS-dom15kurz (b) in *E. coli* Origami(DE3)

Coomassie-gefärbte 19 %ige SDS-Polyacrylamidgele mit Kulturproben vor (0 h) und 1 bis 3 h nach Induktion mit IPTG bei 37 °C; St: *low range*-Proteinstandard.

Nach Zellaufschluss wurden die Thioredoxin-Fusionsproteine in einem ersten Co^{2+} -Affinitätschromatographieschritt aus dem Überstand isoliert, wobei zur Elution die Kompetitor-Konzentration nicht in einem Schritt auf 200 mM gebracht, sondern stufenweise auf dann nur 100 mM erhöht wurde, was für eine vollständige Verdrängung der gebundenen Proteine ausreichend war (Abb. 4.8 a, b). Wie erwartet, konnte der mit PreScission abgespaltene Fusionsanhang mittels erneuter Co^{2+} -Ionen-Affinitätschromatographie vom jeweiligen Zielprotein, nun mit aminoterminalen GP-Überhang, abgetrennt werden (Abb. 4.8 c, d). Als abschließender Reinigungsschritt wurde eine RP-HPLC (Abb. 4.8 e, f) mit auf Octadecylphasen (C18) basierenden Säulen durchgeführt (Kap. 3.7.5.4, Abb. 4.8 e), nachdem wie schon für GPdom15 (Kap. 4.2.4) beim Vergleich der 1D- ^1H -Spektren von Protein vor und nach dem RP-HPLC-Schritt kein Einfluss der denaturierenden Bedingungen der Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie auf die Faltung von GPdom15kurz und GPdom15ldti festgestellt werden konnte. Abb. 4.9 gibt stellvertretend eine Überlagerung der entsprechenden 1D- ^1H -Spektren von GPdom15kurz wieder.

Die PreScission und andere Verunreinigungen, die bei den beiden Affinitätschromatographieschritten nicht separiert und oftmals auch gelelektrophoretisch nicht detektiert wurden, konnten mit Hilfe dieses präparativen Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Laufes abgetrennt werden (Abb. 4.8 e). GPdom15, GPdom15kurz und GPdom15ldti unterschieden sich bezüglich ihres Retentionsverhalten kaum und eluierten jeweils bei etwa 38 % Anteil Eluent B, entsprechend einem Acetonitrilgehalt von etwa 30 % (v/v). Die Proteinase und Reste des Fusionsanhangs wurden erst bei höherem Acetonitrilanteil von der Säule verdrängt (Abb. 4.8 e).

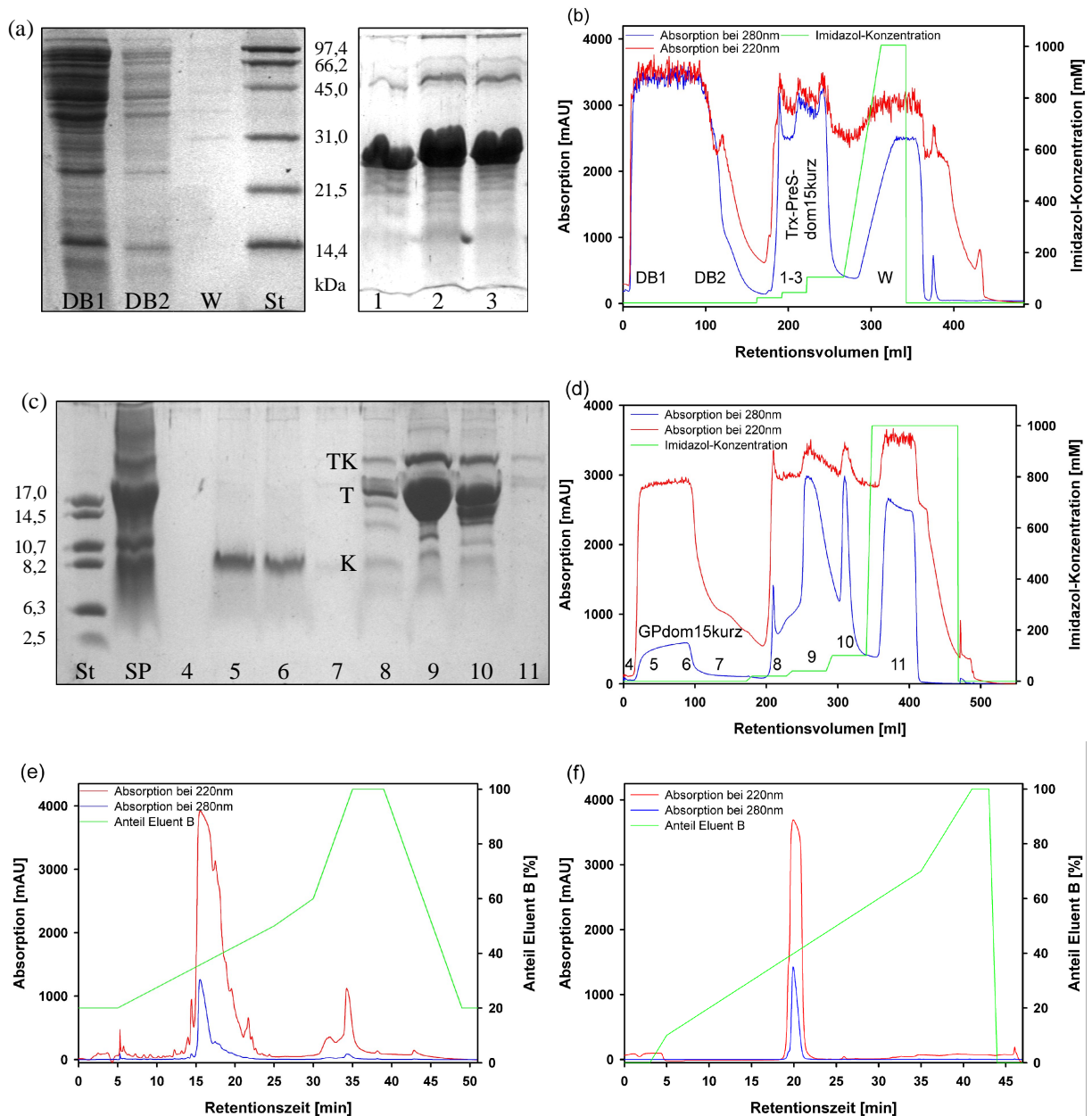


Abb. 4.8: Elektrophoretische Analyse (a, c) des mittels Co^{2+} -Ionen-Affinitätschromatographie gereinigten Fusionsproteins Trx-PreS-dom15kurz (b) bzw. Trx-PreS-dom15kurz-Spaltansatzes (d) sowie die Überprüfung der Reinheit des mittels präparativer Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie gereinigten GPdom15kurz-Proteins (e) durch analytische RP-HPLC (f)

Coomassie-gefärbte 19 %ige SDS-Polyacrylamidgele (a) mit Proben der ersten Affinitätschromatographie (b); DB1, DB2: Durchbruch (Auftragung des Überstandes), 1-3: Trx-PreS-dom15kurz-haltige Fraktionen; W: Waschfraktion; St: *low range*-Proteinstandard; 19 %iges SDS-Polyacrylamidgel nach Schagger und von Jagow (c) mit Proben des zweiten Reinigungsschrittes (d) nach Coomassie-Färbung; SP: Spaltansatz; 4-7: Fraktionen des Durchbruchs; 8-10: Trx-tag-haltige Fraktionen; 11: Regeneration der Säule; TK: Trx-PreS-dom15kurz; T: Trx-PreS; K: GPdom15kurz; St: *FLUKA*-Proteinstandard; Reinigung der aus (d) erhaltenen GPdom15kurz-haltigen Fraktionen mittels präparativer RP-HPLC (e) (konstanter Gradient in 30 min 20-50 % Anteil Eluent B; vgl. Kap. 3.7.5.4) sowie Überprüfung der Reinheit des gereinigten und dann getrockneten Proteins mittels analytischer RP-HPLC (f) (konstanter Gradient in 30 min 10-70 % Anteil Eluent B; vgl. Kap. 3.7.5.4).

Wie die analytische RP-HPLC ergab (Abb. 4.8 f), wurde nach Trocknung der entsprechend vereinigten Fraktionen (hier: Retentionszeit 15-17 min) das Protein in hoher Reinheit erhalten und konnte direkt für die weiteren Charakterisierungsschritte verwendet werden.

Diese Vorgehensweise war zur Gewinnung von sowohl in LB- als auch in Minimal-Medium exprimiertem Protein geeignet. Die Ausbeuten bei der Gewinnung von GPdom15, GPdom15kurz und GPdom15ldti unterschieden sich dabei kaum und betrugen pro Liter LB-Medium jeweils etwa 2,6 g Nasszellgewicht, bzw. etwa 40 mg Fusionsprotein, bzw. ca. 9 mg Protein; bei Kultivierung in Minimalmedium lagen sie etwa 10 bis 20 % niedriger. Aufgrund ihrer Leucinauxotrophie wurde bei Anzucht von *E. coli* Origami(DE3)-Zellen auf Minimalmedium zusätzlich L-Leucin (40 µg/ml), bzw. zur Gewinnung einer NMR-Probe mit ^{15}N -markiertem Protein entsprechend ^{15}N L-Leucin zugesetzt.

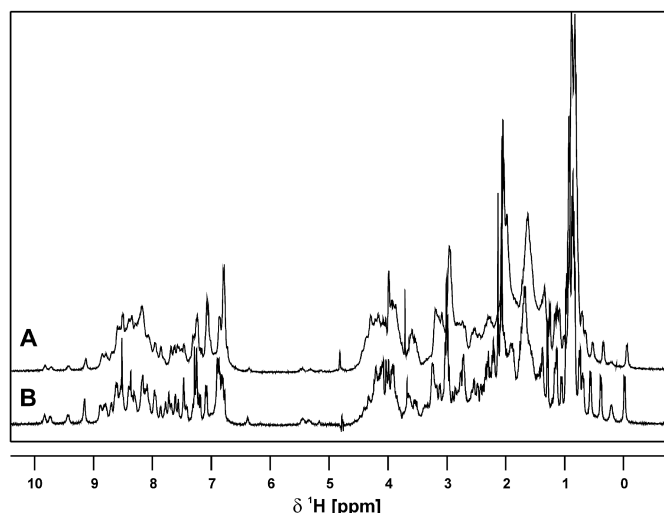


Abb. 4.9: Überlagerung der 1D- ^1H -Spektren von GPdom15kurz vor (A) und nach RP-HPLC-Reinigung (B)

je ca. 1,5 mM in 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH 6.4) mit 10 % (v/v) D_2O ; $T = 298 \text{ K}$; $\text{TD} = 16 \text{ k}$; $\text{NS} = 16$; $\text{SW} = 6410,3 \text{ Hz}$; Bruker Avance Spektrometer DRX400.

4.4 Biophysikalische Charakterisierung der LEKTI-Domäne 15-Varianten

4.4.1 Massenspektrometrie

Das bei ausgebildeter dreifacher Disulfidverbrückung theoretisch zu erwartende Molekulargewicht von GPdom15, für das die aminoterminal Sequenzierung (Kap. 3.9) die korrekte Abfolge der ersten sechzehn Aminosäuren ergab, wurde durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie bestätigt (persönliche Mitteilung, Dr. Peter Kreutzmann, IPF PharmaCeuticals, Hannover). Auch bei Analyse der LEKTI-Domäne 15-Varianten mittels (*elektrospray-ionization*) ESI-Massenspektrometrie wurde die theoretisch zu erwartende molekulare Masse von 8569,6 Da für GPdom15, 6922,9 Da für GPdom15kurz und 5519,6 Da für GPdom15ldti erhalten, so dass die Einbeziehung aller Cysteine in Disulfidbrücken als gesichert betrachtet

werden kann. Die Homogenität der Massenspektren, die in Abb. 4.10 a bis c wiedergegeben sind, war ferner gleichzeitig ein Indiz für die Reinheit der Probe.

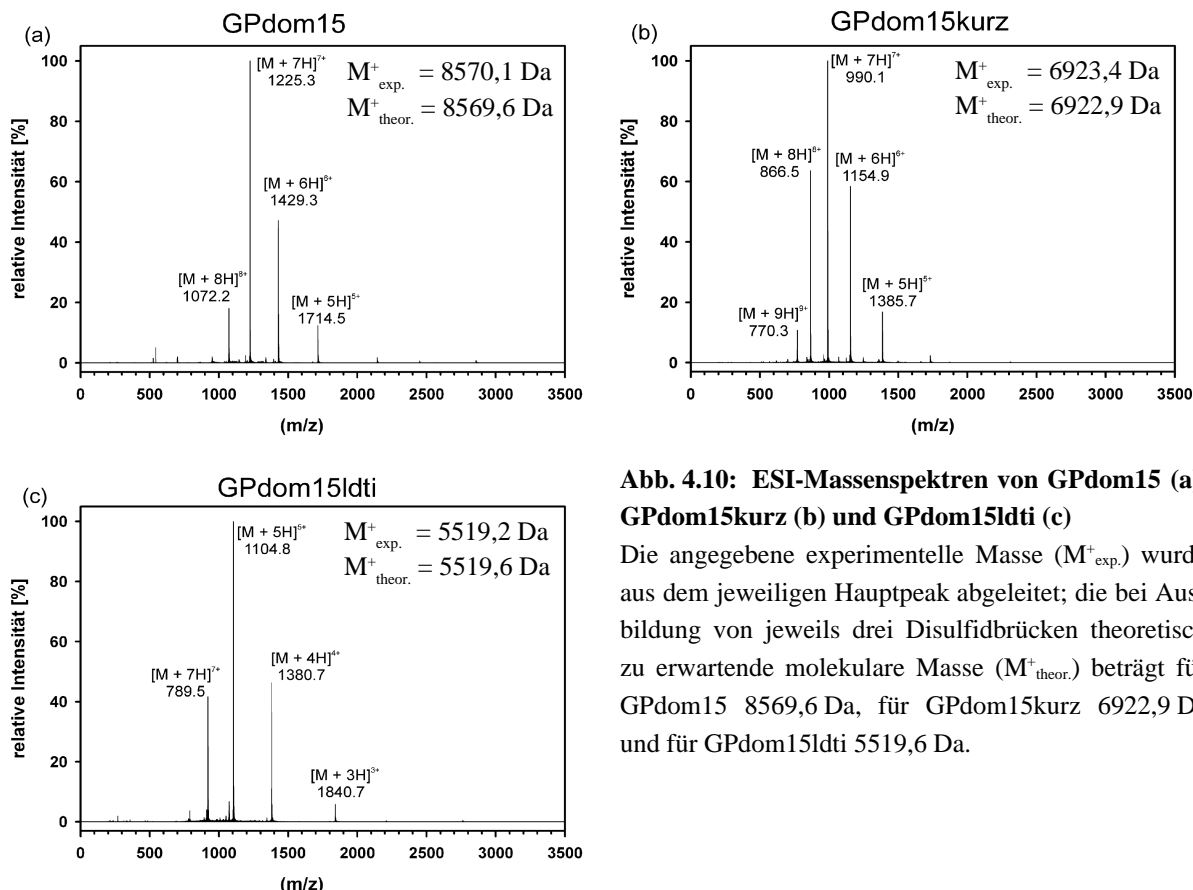


Abb. 4.10: ESI-Massenspektren von GPdom15 (a), GPdom15kurz (b) und GPdom15ldti (c)

Die angegebene experimentelle Masse ($M^+_{\text{exp.}}$) wurde aus dem jeweiligen Hauptpeak abgeleitet; die bei Ausbildung von jeweils drei Disulfidbrücken theoretisch zu erwartende molekulare Masse ($M^+_{\text{theor.}}$) beträgt für GPdom15 8569,6 Da, für GPdom15kurz 6922,9 Da und für GPdom15ldti 5519,6 Da.

4.4.2 CD-Spektroskopie

Zur Untersuchung der Sekundärstruktur der drei Domäne 15-Varianten wurden Fern-UV-CD-Spektren aufgenommen (Kap. 3.14.2). Dabei wurde sowohl die Abhängigkeit der Sekundärstruktur vom pH-Wert als auch von der Temperatur analysiert. Außerdem wurde die thermische Stabilität von GPdom15kurz und GPdom15 durch Aufnahme von CD-Schmelzkurven untersucht (Kap. 3.14.2).

Aus dem Fern-UV-CD-Spektrum GPdom15kurz (Abb. 4.11 a, b), das bei etwa 206 nm ein starkes und bei 219 nm ein schwaches lokales Minimum zeigt, sowie bei 191 nm ein Maximum und bei 197 nm den Nulldurchgang aufweist, kann auf α -helikale Anteile geschlossen werden, da bei rein α -helikalen Proteinen die mittlere molare Elliptizität $[\Theta]_{\text{MRW}}$ unterhalb 200 nm positive Werte annimmt und bei 208 und 222 nm jeweils ein Minimum zu beobachten ist (Greenfield & Fasman, 1969). Nachdem unstrukturierte Proteine ein Elliptizitätsminimum zwischen 200 und 195 nm aufweisen, kann die Verschiebung des Wertes für den Nulldurch-

gang und das Maximum gegenüber den Werten für ein rein α -helikales Protein zu kleinerer Wellenlänge hin auf Abschnitte ohne reguläre Sekundärstruktur zurückgeführt werden.

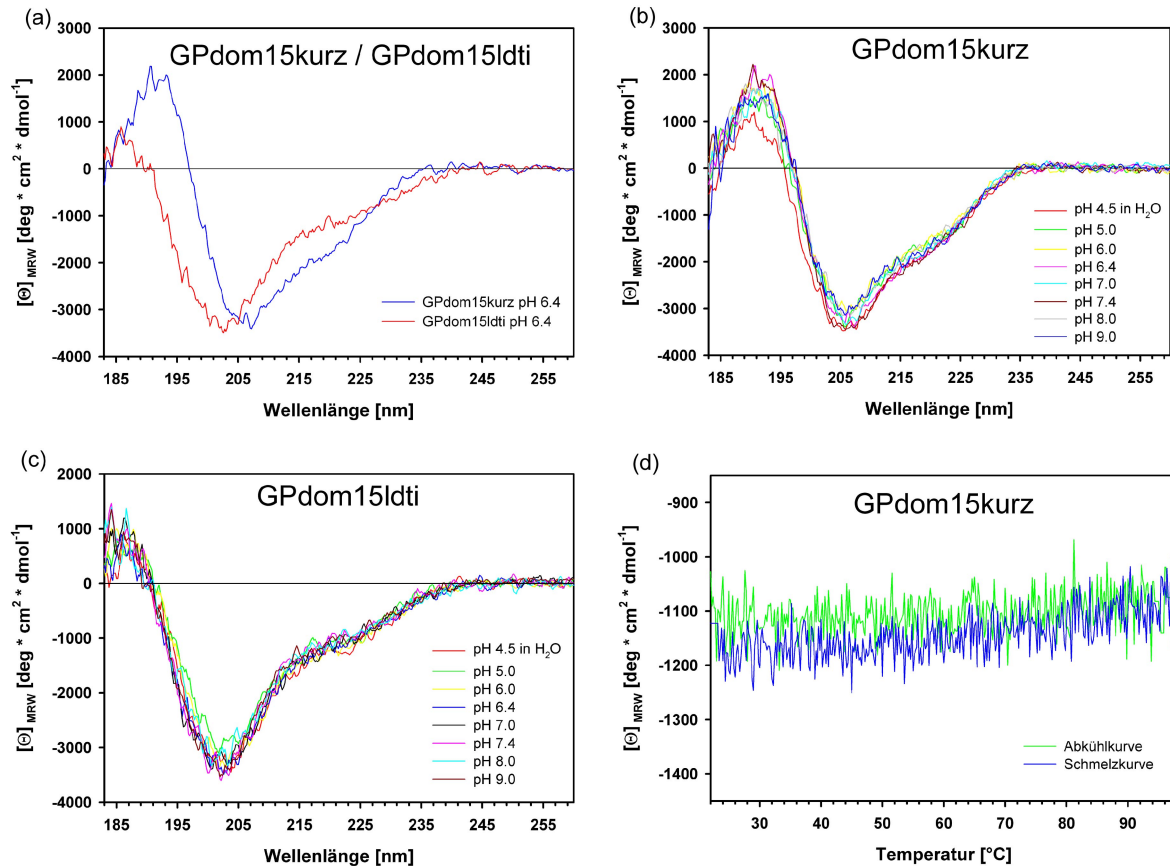


Abb. 4.11: Vergleich der Fern-UV-CD-Spektren von GPdom15kurz und GPdom15ldti (a) und Einfluss des pH-Wertes (b, c) sowie thermischer Übergang von GPdom15kurz (d)

Fern-UV-CD-Spektren von GPdom15kurz und GPdom15ldti jeweils 35 μ M; (a) bei pH 6,4 (b, c) in *aqua bidest.* (pH 4,5) bzw. 10 mM Kalium-Phosphatpuffer (pH 5,0; 6,0; 6,4; 7,0; 7,4; 8,0; 9,0), gemessen 183 bis 260 nm bei 1 mm Schichtdicke und 25 °C; jeweils 10 Akkumulationen; (d) thermischer Übergang von GPdom15kurz (5 μ M in 10 mM Kalium-Phosphatpuffer pH 7,0) gemessen bei 208 nm und 1 cm Schichtdicke mit 1 °C/min Temperaturänderung.

Der Anteil an β -Faltblatt-Strukturen ist schwierig abzuschätzen, da die normalerweise für rein β -Faltblatt-haltige Proteine beobachteten Charakteristika, ein Maximum bei 195 nm und ein Minimum zwischen 215 und 220 nm, nur sehr schwach ausgeprägt sind. Das Fern-UV-CD-Spektrum von GPdom15 stimmt im Wesentlichen mit dem von GPdom15kurz überein, weist aber erwartungsgemäß auf einen deutlich größeren Anteil ohne reguläre Sekundärstruktur hin, wie aus der Verschiebung des Nulldurchganges und des Minimums zu kleineren Wellenlängen (193 bzw. 205 nm) sowie aus dem deutlich schwächer ausgeprägten Maximum bei 189 nm bzw. lokalem Minimum bei 218 nm abgeleitet werden kann (Daten nicht gezeigt). Bei

GPdom15ldti (Abb. 4.11 a, c), das gegenüber dem 61 Aminosäure großen GPdom15kurz 11 Reste weniger aufweist, sind der Nulldurchgang (186 nm) sowie das Elliptizitätsmaximum (191 nm) und -minimum (202 nm) der mittleren molaren Elliptizität $[\Theta]_{MRW}$ gegenüber GPdom15kurz bzw. GPdom15 noch stärker zu kleineren Wellenlängen hin verschoben, so dass GPdom15ldti bezogen auf GPdom15 einen noch größeren Anteil ohne reguläre Sekundärstruktur aufweisen sollte.

Die Evaluierung der Fern-UV-CD-Spektren hinsichtlich der Anteile der einzelnen Sekundärstrukturelemente (Kap. 3.14.3) mit Hilfe der Programme *spectra evaluation* (Jasco, Großumstadt) und *CDPro* (Sreerama *et al.*, 2001) ergab für die drei LEKTI-Domäne 15-Varianten kein einheitliches Ergebnis, bestätigte aber das Vorliegen von helikal und Faltblatt-artig angeordneten Resten. So ermittelte das Programm *spectra evaluation* für GPdom15kurz und GPdom15 nahezu identische Werte von rund 4 % Helix- und 63 % Faltblatt-Struktur bei etwa 33 % unstrukturiertem Protein. Nach *CDPro* sollten bei GPdom15kurz und GPdom15 etwa 11 bzw. 16 % der Reste helikal angeordnet und rund 65 bzw. 54 % an der Ausbildung einer Faltblatt-Struktur beteiligt sein. Für GPdom15ldti wurden 5 % Helix-, 55 % Faltblatt- und 40 % *random coil*-Anteil bzw. mit *CDPro* 12 % Helix- und 63 % Faltblattanteil errechnet. Da neben den regulären Sekundärstrukturelementen auch Disulfidbrücken und aromatische Aminosäuren einen Beitrag zum CD-Signal liefern (Sreerama *et al.*, 1999), der von den Programmen trotz des Zurückgreifens auf Basisspektren nicht immer exakt berücksichtigt werden kann (Sreerama & Woody, 1993), kann dies eine falsche Gewichtung der Sekundärstrukturanteile zur Folge haben. Dies könnte den abgeleiteten hohen Faltblattanteil erklären, der aufgrund der schwachen Ausprägung der für rein β -Faltblatt-haltige Proteine beobachteten Charakteristika nicht zu erwarten war (s.o.).

Die in Abb. 4.11 d stellvertretend gezeigten Schmelz- und Abkühlkurven von GPdom15kurz sind wie bei GPdom15 fast identisch und auch die Elliptizitätswerte blieben für den beobachteten Bereich, von 20 bis 100 °C, nahezu konstant (Daten für GPdom15 nicht gezeigt). Die nach Aufheizen der Probe angefertigten Fern-UV-CD-Spektren unterschieden sich nicht von denen, die vor Erwärmen und nach Abkühlen der Protein-Lösung aufgenommen wurden (Daten nicht gezeigt). Neben dieser thermischen Stabilität konnte auch bei Änderung des pH-Wertes für den Bereich von 4,5 bis 9,0 kein Einfluss auf die Sekundärstruktur der drei LEKTI-Domäne 15-Varianten festgestellt werden (Daten für GPdom15 nicht gezeigt; Abb. 4.11 b, c). Lediglich für GPdom15kurz gelöst in *aqua bidest.* wurde eine geringfügig stärkere

Signalintensität und eine um 1 nm kleinere Wellenlänge für den Nulldurchgang beobachtet. Aufgrund des sonst gleichartigen Kurvenverlaufs gegenüber gepuffertem GPdom15kurz und der Tatsache, dass bei den anderen beiden Domäne 15-Varianten die Kurven für in Wasser gelöstem Protein quasi identisch mit denen für die gepufferten Proteinlösungen sind, kann dies als Messungenauigkeit z.B. bei Erfassen des Referenzspektrums interpretiert werden. Nachdem anhand der Fern-UV-CD-Spektren kein Einfluss des pH-Wertes auf die Sekundärstruktur über einen weiten pH-Bereich (pH 4,5 bis 9,0) festgestellt wurde, konnte für die weiteren NMR-spektroskopischen Untersuchungen ein hierfür günstiger pH-Wert gewählt werden (vgl. Kap. 4.6.1.3).

4.5 Untersuchung der biologischen Aktivität

4.5.1 Inhibierung von Trypsin

Da für die 6. Domäne von LEKTI eine inhibitorische Wirkung gegenüber Trypsin beschrieben wurde (Mägert *et al.*, 1999), sollten auch die drei LEKTI-Domäne 15-Varianten auf ihre Fähigkeit, die Serinproteinase Trypsin zu inhibieren, untersucht werden.

Nach Zugabe von GPdom15, GPdom15kurz und GPdom15ldti wurde hierbei die verbleibende Proteinase-Aktivität anhand der Menge an freigesetztem p-Nitroanilin, dem chromophoren Spaltprodukt des synthetischen Trypsin-Substrats N- α -Benzoyl-D,L-arginin-p-nitroanilid, spektrophotometrisch ermittelt (Kap. 3.12.2). Zur besseren Vergleichbarkeit wurden dabei Trypsin-, Inhibitor- und Substrat-Konzentration in einer Größenordnung – wie für die LEKTI-Domäne 6 beschrieben – verwendet (Mägert *et al.*, 1999).

Wie die zeitliche Änderung der Absorption bei 405 nm für die Inhibitions- und Kontrollreaktionen zeigt (Abb. 4.12 a-c), setzt sowohl GPdom15 als auch GPdom15kurz die Trypsinaktivität bereits ab einer Konzentration von 100 nM deutlich herab und bringt diese ab 500 nM beinahe völlig zum Erliegen, während für die LDTI-Variante auch bei 1000 nM noch keine inhibitorische Wirkung festzustellen ist. Für GPdom15 wird dabei eine geringfügig stärkere Trypsin-Hemmung als für GPdom15kurz beobachtet, was sich auch in den Werten für die relative Trypsinaktivität, die sich aus dem Verhältnis der jeweils um den BAPNA-Zerfallswert reduzierten Absorptionen von inhibierter zu nicht gehemmter Spaltung ergeben, widerspiegelt (Tab. 4.1).

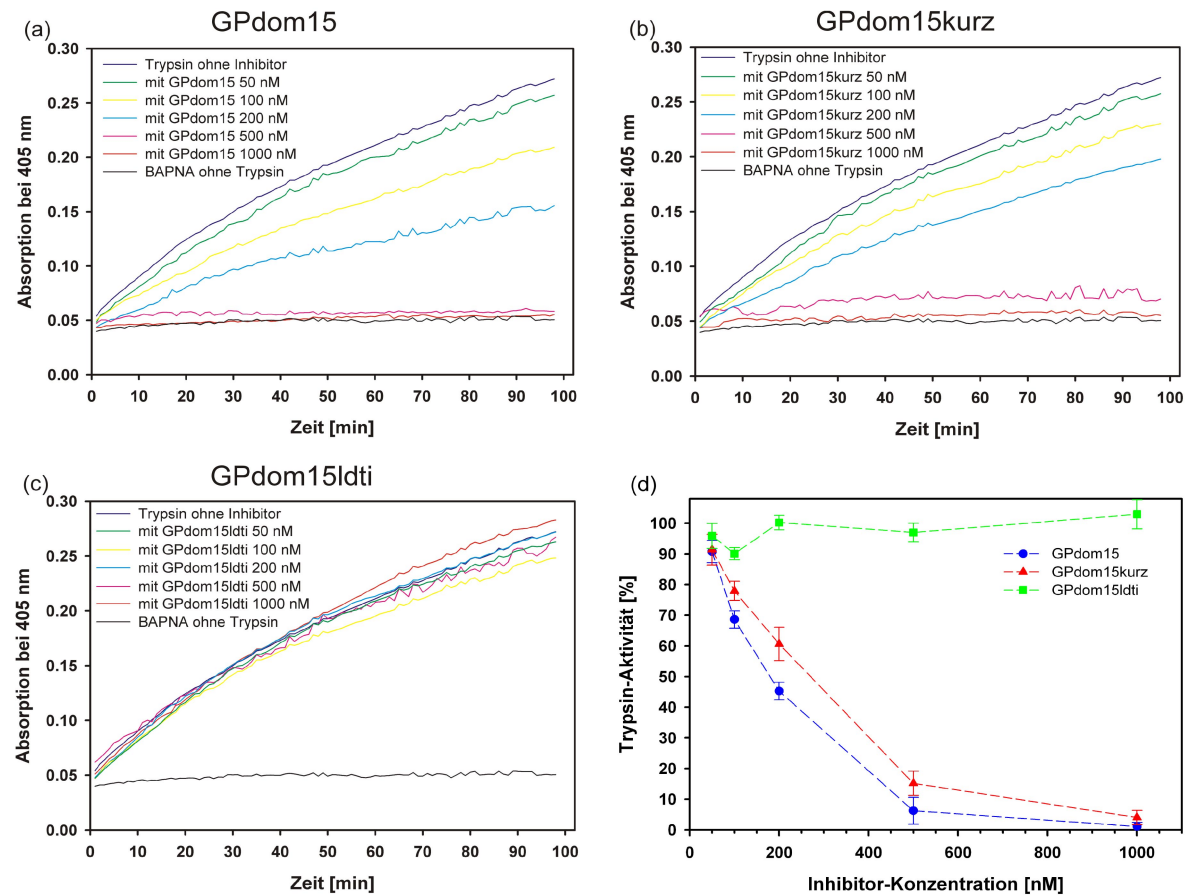


Abb. 4.12: Einfluss der drei Domäne 15-Varianten auf die Trypsinaktivität bei verschiedenen Konzentrationen (a-c) und Abhängigkeit der relativen Trypsinaktivität von der Inhibitor-Konzentration (d)
(a-c): Zeitlicher Verlauf der Absorption bei 405 nm; Kontrollreaktionen: BAPNA ohne Trypsin, Trypsin ohne Inhibitor; Messung bei einer Trypsin-Konzentration (laut Einwaage der Stammlösung) von 4,17 µg/ml und 1 mM BAPNA bei 21 °C; (d): Fehlerbalken der Datenpunkte für die relative Trypsinaktivität geben die Standardabweichungen bezüglich der Mittelwerte wieder, die auf 90 Werten je Konzentration und Inhibitor basieren.

Tab. 4.1: Relative Inhibierung der Trypsinaktivität

Relative Inhibierung der Trypsinaktivität [%]			
Konz [nM]	GPdom15	GPdom15kurz	GPdom15ldti
50	7	7	3
100	32	22	8
200	54	40	0
500	93	86	3
1000	99	97	0

Trypsin-Konzentration (laut Einwaage der Stammlösung): 4,17 µg/ml; die Werte wurden aus dem Verhältnis der jeweils um den BAPNA-Zerfallswert reduzierten Absorptionen von inhibierter zu nicht gehemmter Spaltung ermittelt; Messwerte wurden bei 21 °C bestimmt.

Die relative Trypsinaktivität blieb bei allen Ansätzen nach etwa 10 min nahezu konstant und ergab die in Abb. 4.12 d gezeigte Abhängigkeit von der Inhibitor-Konzentration. Die daraus abgeleitete zu 50 % inhibitorisch wirkende Konzentration IC_{50} beträgt bei der hier eingesetzten Trypsin-Menge von 4,17 $\mu\text{g/ml}$ (ohne Berücksichtigung des Anteils an inaktiviertem Chymotrypsin einer Trypsin-Konzentration von maximal 175 nM entsprechend) für GPdom15 etwa 175 nM bzw. für GPdom15kurz etwa 245 nM. Die ermittelten IC_{50} -Werte liegen damit in der gleichen Größenordnung wie von Mägert *et al.* (1999) für die LEKTI-Domäne 6 (ca. 150 nM bei 6,25 $\mu\text{g/ml}$ Trypsin) beschrieben.

Außer einer festgestellten starken Trypsinhemmung war mit dem vorliegenden Testsystem aufgrund der fehlenden Möglichkeit zur Temperaturregulierung und aufgrund einer nicht hinreichend genau bekannten Konzentration von Proteinase, Substrat und Inhibitor keine weitergehende Ableitung enzymkinetischer Hemmdaten möglich. Die Zunahme der Extinktion erfolgte nicht wie erwartet linear, was beispielsweise auf eine Temperaturschwankung zurückzuführen sein könnte. Auf die Ermittlung der relativen Inhibierung bzw. Trypsinaktivität wirkt sich dies aber nicht weiter störend aus.

4.5.2 Test auf Inhibierung weiterer Proteinasen und Bestimmung der inhibitorischen Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_i

Nachdem die eigentliche Zielproteinase von LEKTI bislang noch nicht bekannt ist (Mägert *et al.*, 2002 a; Komatsu *et al.*, 2003; Jayakumar *et al.*, 2004), sich aber herausgestellt hatte, dass Trypsin von GPdom15 und GPdom15kurz inhibiert wird (Kap. 4.5.1), wurde in Kooperation mit Prof. Dr. Christian P. Sommerhoff (Universität München) das enzymkinetische Verhalten von Trypsin (EC 3.4.21.4) gegenüber den LEKTI-Domäne 15-Varianten genauer untersucht sowie eine mögliche inhibitorische Wirkung auf verschiedene weitere Serinproteinasen getestet.

Neben β -Tryptase (EC 3.4.21.59), die aufgrund der starken Sequenzhomologie vor allem der inhibitorischen Schleife der 15. LEKTI-Domäne zu dem einzig bislang natürlich vorkommenden Tryptase-Inhibitor LDTI (Sommerhoff *et al.*, 1994) von besonderem Interesse war (Abb. 4.13), wurden dabei auch verschiedene Proteinasen des Blutgerinnungs- bzw. des Fibrinolyse-systems (Faktor Xa (EC 3.4.21.6), Thrombin (EC 3.4.21.5), Urokinase (EC 3.4.21.73), Plasmin (EC 3.4.21.7)) auf Inhibierung getestet. Außerdem wurde untersucht, ob Gewebe-Kallikrein (EC 3.4.21.35) vom Schwein (*Sus scrofa*) sowie das auch als *stratum corneum tryptic enzyme* (SCTE) bezeichnete Kallikrein hK5 (*human Kallikrein 5*; Yousef & Diamandis,

2001), wie es im menschlichen Gewebe gefunden und im Zusammenhang mit dem Krankheitsbild des Netherton Syndroms diskutiert wird (Komatsu *et al.*, 2002), durch die LEKTI-Domäne 15-Varianten gehemmt werden. Auch wurde das inhibitorische Verhalten gegenüber Subtilisin (EC 3.4.21.62), PMN-Elastase aus humanen polymorphkernigen Granulozyten (EC 3.4.21.37) und Chymotrypsin (EC 3.4.21.1) überprüft.

Eine inhibitorische Wirkung konnte dabei für GPdom15 und GPdom15kurz zusätzlich zur bekannten Trypsinhemmung gegenüber Plasmin festgestellt werden. Wie die weitere Untersuchung der enzymkinetischen Eigenschaften ergab, verhalten sich die beiden LEKTI-Domäne 15-Varianten gegenüber Trypsin bzw. Plasmin als kompetitive Inhibitoren, so dass hier für die reversible Inhibierung im Gleichgewicht folgende Beziehung zwischen freiem Enzym (E), freiem Inhibitor (I) und Enzym/Inhibitor-Komplex (EI) gilt (Gleichung 3-4; Kap. 3.12.3).



Die Werte der inhibitorischen Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_i des Enzym/Inhibitor-Komplexes wurden für Plasmin und Trypsin wie beschrieben nach Morrison (1969) abgeleitet (Kap. 3.12.3), nachdem jeweils die verbleibende Enzymaktivität gegenüber fluorogenen Substraten bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen erfasst worden war.

Tab. 4.2: Übersicht über die inhibitorische Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_i der LEKTI-Domäne 15-Varianten für Trypsin bzw. Plasmin

LEKTI-Domäne 15-Variante	inhibitorische Konstante K_i [nM]	
	Trypsin	Plasmin
GPdom15	0,8	0,5
GPdom15kurz	0,8	0,7
GPdom15ldti	<i>k.I.</i>	<i>k.I.</i>

Die K_i -Werte wurden wie in Kap. 3.12.3 beschrieben ermittelt; für GPdom15ldti wurde keine Inhibierung (*k.I.*) von Trypsin oder Plasmin festgestellt.

Für GPdom15 und GPdom15 kurz ergaben sich nahezu identische K_i -Werte, die sowohl für Trypsin als auch für Plasmin bei etwa 0,5 nM liegen (Tab. 4.2) und damit die bereits festgestellte starke Hemmung von Trypsin (Kap. 4.5.1) bestätigen. Wenn, wie in diesem Fall, die Werte für die eingesetzte Proteinase menge ($[E] \leq 1$ nM) und für die inhibitorischen Dissozia-

tionskonstanten K_i etwa gleich groß sind, liegen im Reaktionsgleichgewicht Inhibitor und Enzym etwa zu gleichen Teilen frei und an Enzym gebunden vor (Bieth, 1995), und der Inhibitor kann nach einer Einteilung von Morrison (1982) als festbindend (*tight-binding*) gegenüber der Proteinase eingestuft werden.

4.5.3 Test auf Inhibierung der HIV-Infektion

Die LEKTI-Domäne 15 zeigt eine starke Homologie (Abb. 4.13) zu dem Tryptase-Inhibitor LDTI (Sommerhoff *et al.*, 2000), für den eine Inhibierung der HIV-1-Replikation festgestellt wurde (Auerswald *et al.*, 1994).

	10	20	30	40	50	60	70
LEKTI	DSEMCKDYRVLP	PRIGYLCPKDLK	PVCGDDGQTYNN	PCML-CHENLIRQ	TNTHIRSTGKCEES	STPGTTAASMP	PSDE
	...	:	:	:	:	:	:
LDTI	-KKVCA-----	CPKILKPVCGSD	GRTYANSCIARC	-----	NGVSIKSEGSC	PTTGILN	
		10	20		30	40	

Abb. 4.13: Vergleich der Aminosäuresequenz der LEKTI-Domäne 15 und des Tryptase-Inhibitors LDTI

Identische (:) und ähnliche Reste (.) sind markiert; basierend auf einem mit LALIGN (http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html) erstellten Vergleich.

Daher sollte in einem Standardtest die Infektionseffizienz von HI-Viren (HIV_{NL4-3}) gegenüber Zellen einer humanen Zelllinie (174xCEM-Zellen) bei Anwesenheit zunächst nur von GPdom15 und GPdom15kurz untersucht werden (Kap. 3.12.1), da von GPdom15ldti keine hierfür ausreichende Menge strukturierten Materials gewonnen werden konnte. Als Maß für die Inhibierung der Virusinfektionen bzw. -vermehrung diente hierbei die Menge an gebildetem viralen Protein p24, dem Hauptkapselprotein des HI-Virus. Diese steht in direktem Zusammenhang mit der Menge an replizierten HI-Viren (Bourinbaiar, 1991; Layne *et al.*, 1992; McKeating & Moore, 1991) und wurde mittels ELISA quantifiziert (Giacomini *et al.*, 1998; Kap. 3.12.1). Nachdem LDTI ab einer Konzentration von 20 μ M (Auerswald *et al.*, 1994) bzw. SLPI bereits ab einer Konzentration von 1 μ M inhibitorisch auf die HIV-Verbreitung wirkt (Skott *et al.*, 2002) – beides Vertreter der Familie der Serinproteinase-Inhibitoren – wurden die beiden Proteine GPdom15 und GPdom15kurz in den Konzentrationen 5 und 50 μ M eingesetzt.

Die Messdaten des HIV-Inhibitionstests sind in Tabelle 4.3 aufgeführt und in Abb. 4.14 grafisch dargestellt.

Eine antivirale Eigenschaft von GPdom15 bzw. GPdom15kurz konnte nicht festgestellt werden. Weder bei einer TCID₅₀ von 100 noch bei einer geringeren Menge infektiöser Partikel

(TCID₅₀ = 10) wurde für GPdom15 bzw. GPdom15kurz eine reduzierte Bildung von viralem Protein p24 beobachtet. Vielmehr war unter diesen Bedingungen eine erhöhte Infektionsrate festzustellen, während mit Hilfe des Reverse-Transkriptase-Inhibitors (–)3TC (Lamivudin) eine effiziente Verminderung der Virusreplikation erreicht wurde. Eine Beeinträchtigung des Zellwachstums durch die beiden GPdom15-Proteine wurde in Vergleichstests mit Zellen ohne Viren aber unter Zugabe der beiden Domäne 15-Varianten ausgeschlossen (Daten nicht gezeigt).

Tab. 4.3: Messdaten des HIV-Inhibitionstests

Tage	MOI	TCID ₅₀	GPdom15kurz		GPdom15		Positiv-Kontrolle	(–)3TC / IC ₉₅
			5 µM	50 µM	5 µM	50 µM		
2	0.0002	10	88	85	77	97	167	59
	0.002	100	911	1359	831	1128	1506	687
4	0.0002	10	21996	25413	26136	26079	27901	1573
	0.002	100	29199	32353	29058	27968	18402	856
6	0.0002	10	51594	43786	51822	45742	32274	6521
	0.002	100	43545	53266	47998	48265	30963	2795

MOI: *multiplicity of infection*; Multiplizität der Infektion; TCID₅₀: *tissue culture infective dose*₅₀, Verdünnungsfaktor für die eine Gewebekultur zu 50 % infizierende Dosis, hier von HI-Virus (HIV_{NL4-3}) bei 174xCEM-Zellen; Positiv-Kontrolle: ohne Inhibitorzusatz; (–)3TC/IC₉₅: Reverse-Transkriptase-Inhibitor (–)3TC (Lamivudin) in einer zu 95 % inhibitorisch wirkenden Konzentration; Messdaten: Menge an gebildetem viralem Protein p24 [pg/ml].

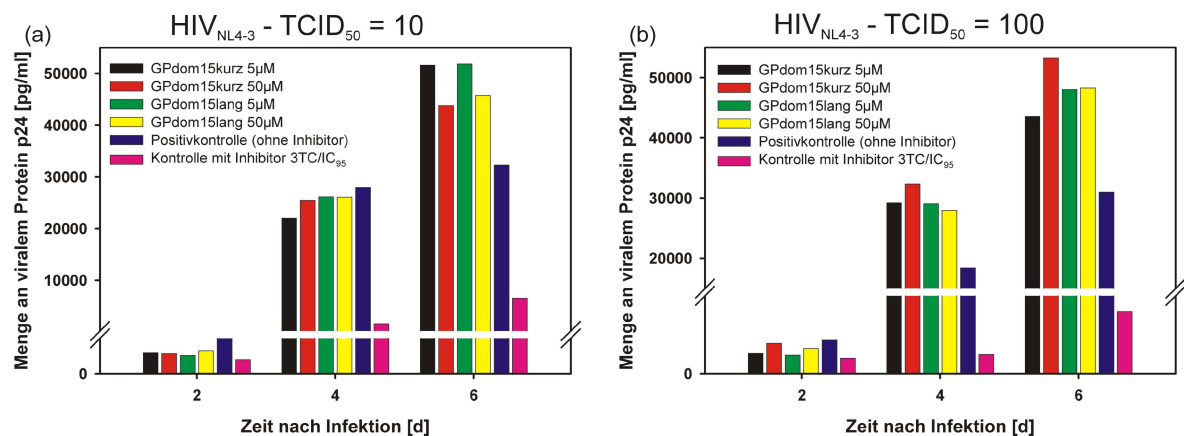


Abb. 4.14: Einfluss von GPdom15kurz und GPdom15 auf die Menge an gebildetem viralem Protein p24 bei Infektion von 174xCEM-Zellen mit einer HIV_{NL4-3}-TCID₅₀ von 10 (a) und 100 (b)

TCID₅₀: *tissue culture infective dose*₅₀, Verdünnungsfaktor für eine die Gewebekultur zu 50 % infizierende Dosis, hier von HI-Virus HIV_{NL4-3} bei 174xCEM-Zellen; Positiv-Kontrolle: ohne Inhibitorzusatz, (–)3TC/IC₉₅: Reverse-Transkriptase-Inhibitor (–)3TC (Lamivudin) in einer zu 95 % inhibitorisch wirkenden Konzentration.

4.6 Strukturbestimmung von GPdom15 / GPdom15kurz in Lösung

4.6.1 Gewinnung von Randbedingungen mittels NMR-Spektroskopie

Eine Bestimmung der dreidimensionalen Struktur von biologischen Makromolekülen ist mittels Moleküldynamik-Simulationen bislang nur unter Berücksichtigung experimenteller Daten z.B. aus NMR-Experimenten oder einer Röntgenstrukturanalyse möglich. Zur Ableitung und Gewinnung ausreichender Mengen möglichst eindeutiger Randbedingungen aus den experimentellen Daten (Kap. 3.16.2) werden im Fall der NMR-Spektroskopie Spektren von hoher Qualität bzw. Interpretierbarkeit benötigt.

4.6.1.1 Optimierung der Probenbedingungen

Das 1D- ^1H -NMR-Experiment erlaubt hierzu eine erste qualitative Einschätzung der vorliegenden Probe. So kann aus der Signalintensität (Signal-Rausch-Verhältnis), die proportional zur Anzahl der in der Probe vorhandenen ^1H -Kerne ist, auf Löslichkeit bzw. Proteinkonzentration rückgeschlossen werden, während anhand der Dispersion der Resonanzsignale Aussagen über Sekundär- und Tertiärstruktur abgeleitet werden können. Im Gegensatz zu ungefalteten Proteinen, die sich hinsichtlich ihrer ^1H -Frequenzen nur wenig unterscheiden (Wüthrich, 1986), kommt es bei strukturierten Proteinen durch die räumliche Nähe der Atome zu Wechselwirkungen und damit zu einer unterschiedlichen elektronischen Umgebung der Kerne, wodurch deren chemische Verschiebungen verschieden stark beeinflusst werden. Gegenüber unstrukturierten Proteinen erscheinen die Signale dann über einen weiteren Bereich der ppm-Skala verteilt (größerer Dispersion).

Das 1D- ^1H -Spektrum (Abb. 4.15) von GPdom15, das abschließend mittels Größenausschlusschromatographie gereinigt wurde (Kap. 3.7.5.4), zeigt eine hohe Dispersion von knapp 10 ppm. Insbesondere die Dispersion im Bereich der Methylprotonen, mit einzelnen stark hochfeldverschobenen Signalen um 0 ppm, wie es bei Wechselwirkung mit aromatischen Seitengruppen typisch ist (Kap. 4.6.8), und auch die hohe Dispersion für die Amidprotonen – von 9,7 bis 7 ppm – sind charakteristisch für Proteine mit ausgeprägter Tertiärstruktur. Die Beteiligung eines Faltblattes an der Struktur kann aus den einzelnen Signalen zwischen 5 und 6 ppm abgeleitet werden, bei denen es sich hierbei offensichtlich um zu tieferem Feld verschobene $\text{H}\alpha$ -Resonanzen handelt (Kap. 3.15.5.2). Mit Hilfe von 1D- ^1H -Experimenten lassen sich ferner die für weitere NMR-Experimente optimalen Messbedingungen (pH-Wert, Salzkonzentration, Temperatur, etc.) ermitteln, bei denen die beste Dispersion bzw. Signalintensität erreicht wird.

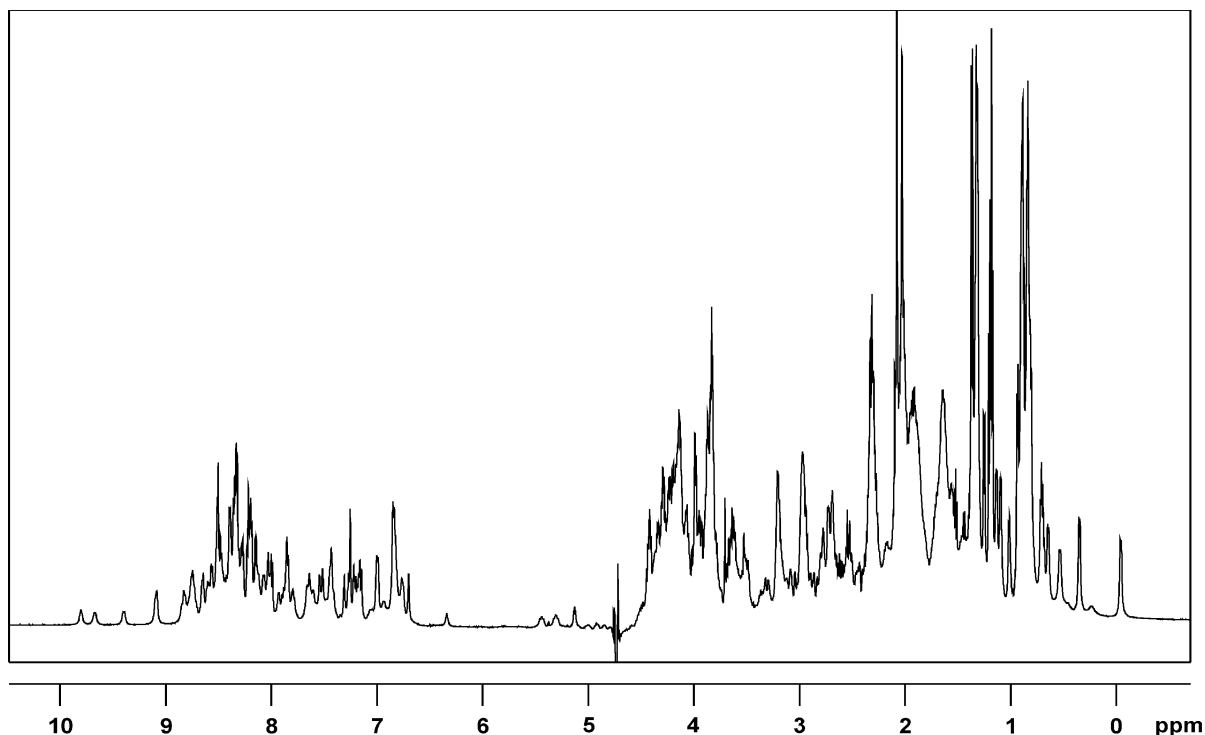


Abb. 4.15: 1D-¹H-Spektrum von GPdom15

GPdom15 nach Reinigung mittels Größenausschlusschromatographie, 300 μ M, in *aqua bidest.*; pH 4,5; 10 % (v/v) D₂O; 0,03 % (w/v) NaN₃; T = 298 K; TD = 16 k; NS = 1 k; SW = 8389,3 Hz; Bruker Avance Spektrometer DRX600.

Die Überprüfung, inwieweit die Temperatur die Spektrenqualität von GPdom15 beeinflusst, ergab, dass in dem Bereich von 20 bis 34 °C nur geringfügige Änderungen auftreten, wie eine Überlagerung entsprechender 1D-Spektren zeigt (Abb. 4.16). Während die Signalschärfe für einige Methylprotonen mit steigender Temperatur zunahm, wurde die sehr feine Aufspaltung der Resonanzen der aromatischen Seitenketten ($7,0 \pm 0,2$ ppm; Wüthrich, 1986) nur für Temperaturen unterhalb von 26 °C beobachtet, weshalb die weiteren NMR-Experimente, bis auf den ersten Satz homonuklearer 2D-Spektren (bei 23 °C), bei 25 °C durchgeführt wurden.

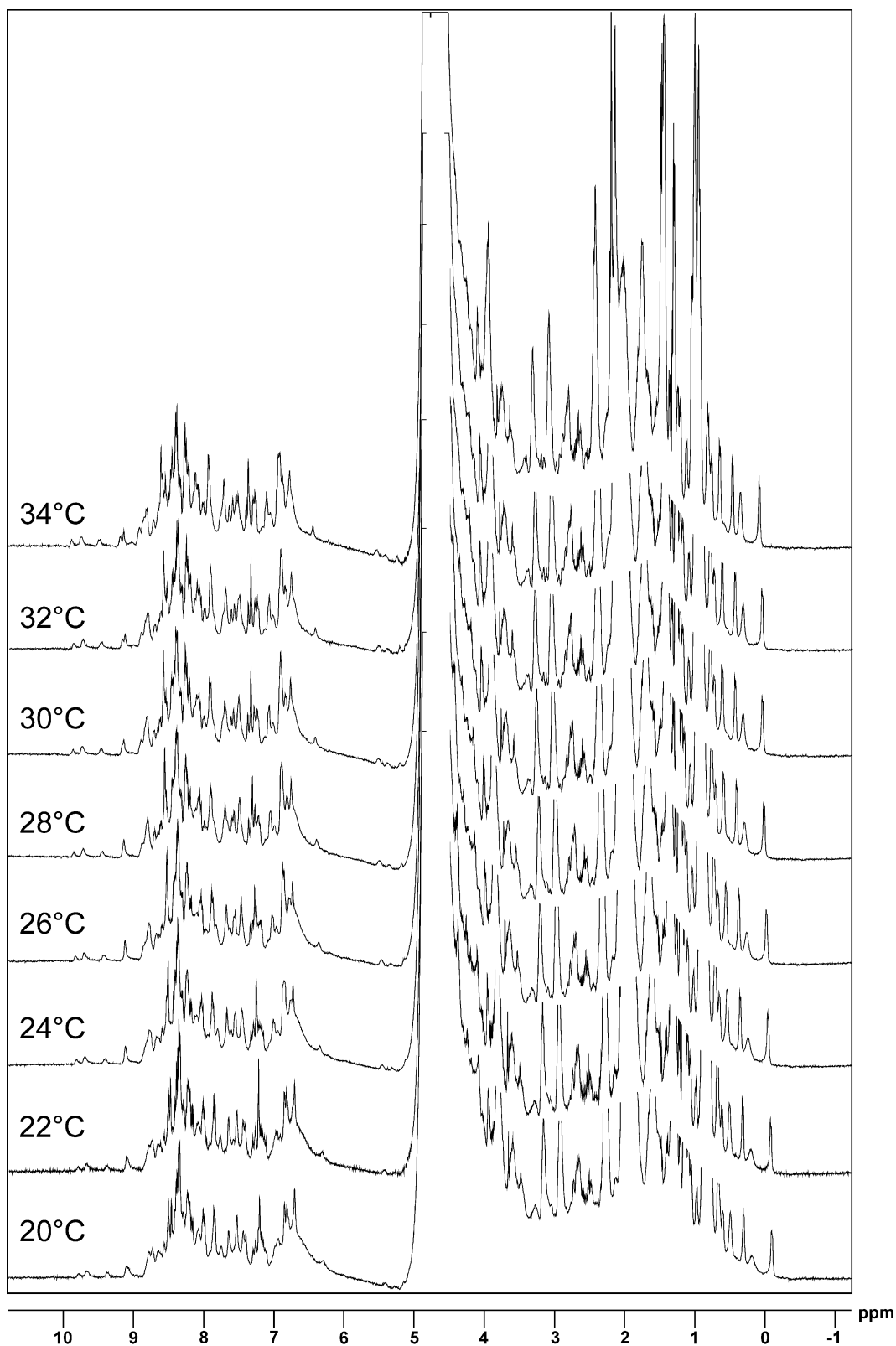


Abb. 4.16: Einfluss der Temperatur auf die Qualität der $1D-^1H$ -Spektren von GPdom15

Überlagerung der bei verschiedenen Temperaturen aufgenommenen $1D-^1H$ -Spektren von GPdom15 nach Reinigung mittels Größenausschlusschromatographie, 300 μM , in *aqua bidest.*; pH 4,5; 10 % (v/v) D_2O ; 0,03 % (w/v) NaN_3 ; TD = 16 k; jeweils NS = 128; SW = 4807.6 Hz; Bruker Avance Spektrometer DRX400.

4.6.1.2 Identifizierung von Spinsystemen und sequentielle Zuordnung der Resonanzen

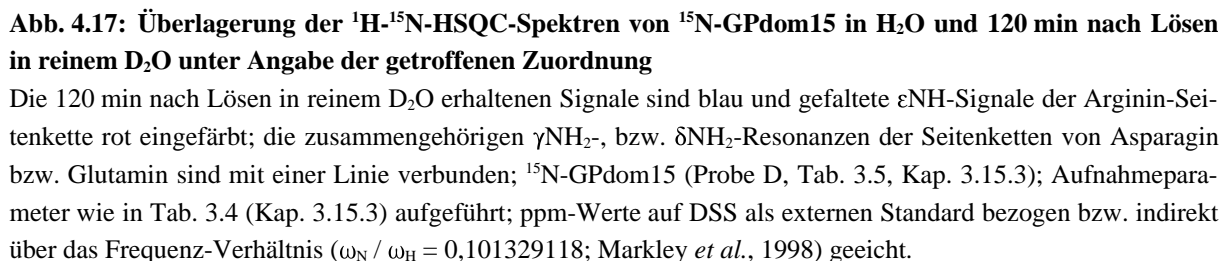
Um ein verbessertes Signal-Rausch-Verhältnis und somit eine geringere Aufnahmedauer zu erzielen, wurde für weiterführende Experimente eine höher konzentrierte Probe von GPdom15 eingesetzt (2,5 mM, in *aqua bidest.*; pH 4,5; Probe A, Tab. 3.5, Kap. 3.15.3). Nachdem kein negativer Einfluss der höheren Konzentration, wie etwa Aggregationsphänomene, in 1D-Spektren festgestellt worden war (Daten nicht gezeigt), wurde mit dieser Probe eine Serie homonuklearer 2D-Experimente durchgeführt (Tab. 3.4, Kap. 3.15.3). So wurden zwei TOCSY-Spektren, jeweils eines bei 60 ms und, um den Magnetisierungstransfer auch bei einer längeren Seitenkette für das gesamte Spinsystem zu gewährleisten, bei 80 ms Mischzeit aufgenommen, sowie neben einem COSY-Experiment zwei NOESY-Spektren bei 150 ms und 300 ms Mischzeit gemessen (Kap. 3.15.5.1).

Während eine Identifizierung der Spinsysteme (Kap. 3.15.5.1) der Aminosäuren mit separierten Signalen für das Proteinrückgrat, wie z.B. für Tyr33 ($\delta(^1\text{H})\text{HN} = 9,4$ ppm), relativ leicht möglich war, war eine eindeutige Identifizierung bzw. Zuordnung vor allem für die Aminosäuren mit *random coil* Verschiebungen im $\delta(^1\text{H})\text{HN}$ -Bereich von etwa 8,6 bis 7,8 ppm durch Signalüberlappung erheblich erschwert (vgl. Abb. 4.19, Kap. 4.6.1.5). Aber auch bei etlichen Aminosäuren, die keine typischen *random coil* Frequenzen aufwiesen, kam es zur Überlagerung von Resonanzen. So ist beispielsweise die HN-Verschiebung ($\delta(^1\text{H})\text{HN} = 8,86 - 8,88$ ppm) für die Aminosäuren Lys23, Cys26 und Glu59 nahezu identisch (vgl. Anhang, Kap. 10.2), weshalb auch die TOCSY- und NOESY-Signale der zugehörigen Seitenkettenprotonen bei derselben Frequenz erschienen. Dadurch wurde eine eindeutige Zuordnung – hier auch aufgrund der räumlichen Nähe von Glu59 und Cys26 – insbesondere der NOESY-Peaks verhindert (Kap. 3.16.2.1).

4.6.1.3 ^{15}N -editierte 3D-NMR-Experimente zum Auflösen von Signalüberlagerungen

Da bei ^{15}N -editierten 3D-NMR-Experimenten die Resonanzen entlang der Stickstoff-Dimension aufgespalten sind und daher die Wahrscheinlichkeit von Signalüberlappung in den entsprechenden Spektren reduziert ist, wurden entsprechende heteronukleare NMR-Experimente unter Verwendung einer ^{15}N markierten GPdom15-Probe durchgeführt. Das mittels RP-HPLC gereinigte Protein wurde nach Lyophilisieren in 50 mM Kalium-Phosphat-Puffer aufgenommen, wobei der verwendete pH-Wert von 6,4 einen Kompromiss zwischen Löslichkeit (theoretischer pI-Wert: 5,24; Bjellqvist *et al.*, 1993; Bjellqvist *et al.*, 1994; Wilkins *et al.*, 1998),

Ein Einfluss des pH-Wertes auf die Sekundärstruktur war aufgrund der nahezu unveränderten Fern-UV-CD-Spektren über einen weiten pH-Bereich (pH 4,5 bis 9,0; Kap. 4.4.2) nicht zu erwarten und konnte ebenso wie etwaige nachteilige Auswirkungen auf die Spektren-Qualität



Ein Einfluss des pH-Wertes auf die Sekundärstruktur war aufgrund der nahezu unveränderten Fern-UV-CD-Spektren über einen weiten pH-Bereich (pH 4,5 bis 9,0; Kap. 4.4.2) nicht zu erwarten und konnte ebenso wie etwaige nachteilige Auswirkungen auf die Spektren-Qualität

durch Vergleichen eines weiteren Satzes homonuklearer Spektren einer nun ebenfalls RP-HPLC gereinigten unmarkierten Probe mit den entsprechenden Aufnahmen, die bei pH 4,5 erfolgten (s.o.), ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt).

Eine erste Abschätzung, inwiefern die ^{15}N -markierte Probe unter den vorliegenden Bedingungen für weitere 3D-Experimente und so für eine Strukturbestimmung geeignet ist, erlaubt die Analyse des zweidimensionalen ^1H , ^{15}N -HSQC-Spektrums (Kap. 3.15.3). Neben den allgemeinen Merkmalen wie Signal-Rausch-Verhältnis oder Linienbreiten ist hierbei vor allem die Anzahl an Resonanzen und der Grad der Signalüberlagerung von Interesse.

Wie bereits bei den homonuklearen Spektren fällt auch hier zunächst die für Proteine mit ausgeprägter Tertiärstruktur charakteristische hohe Dispersion der Amidresonanzen von rund 3,5 ppm auf (Abb. 4.17). Zwar gibt es einige Bereiche mit Signalüberlapp – wie schon in den homonuklearen Spektren – insbesondere bei Verschiebungen, wie sie typischerweise für Proteine ohne reguläre Strukturelemente beobachtet werden, dennoch sind die meisten Signale aufgrund unterschiedlicher ^{15}N -Frequenzen deutlich separiert. So war beispielsweise die Überlagerung der HN-Resonanzen von Lys23, Cys26 und Glu59 (s.o.), die in den homonuklearen 2D-Spektren bei nahezu identischer ^1H -Verschiebung beobachtet wurden, aufgelöst. Das Auftreten einiger zusätzlicher Peaks trotz RP-HPLC-Reinigung ist vermutlich auf Verunreinigung zurückzuführen. Hinweise, dass die Ursache konformationeller Heterogenität ist, fanden sich in keinem der Spektren. Auch wirkten sich diese Resonanzen auf die Auswertung der 3D-Aufnahmen nicht weiter störend aus, da meist keine entsprechenden Signalleitern im zugehörigen NOESY-Spektrum vorhanden waren.

4.6.1.4 Sequenzspezifische Zuordnung der Resonanzen mittels *chain tracing* in ^{15}N -editierten NOESY-Spektren

Zur Identifizierung von Resonanzen der Seitenkettenprotonen wurden TOCSY-HSQC- und HNHA-Experimente eingesetzt (Kap. 3.15.5.1). Unter Berücksichtigung des Informationsgehaltes dieser Aufnahmen wurden die NOESY-Leitern in Form von sogenannten *stripes*, die aus den Kuben der 3D-NOESY-Spektren wie beschrieben extrahiert wurden (Kap. 3.15.5.1), mit Hilfe von eindeutig sequentiellen NOEs (Wüthrich, 1986) entsprechend der Aminosäuresequenz nebeneinander angeordnet. Unterstützend hierzu wurden die Informationen des ^1H , ^{15}N , ^{15}N -HMQC-NOESY-HSQC-Spektrums, das über dipolare Wechselwirkungen der Amidprotonen vom Typ $\text{HN}_{(i)}\text{HN}_{(i+1)}$ die Stickstoff-Verschiebung der in der Sequenz benachbarten Aminosäure liefert, ausgenutzt. Als Beispiel illustriert Abb. 4.18 die sequentielle Zuordnung

der *stripes* mittels des sogenannten *chain tracing* für den Bereich His51 bis Thr55 (Kap. 3.15.5.1).

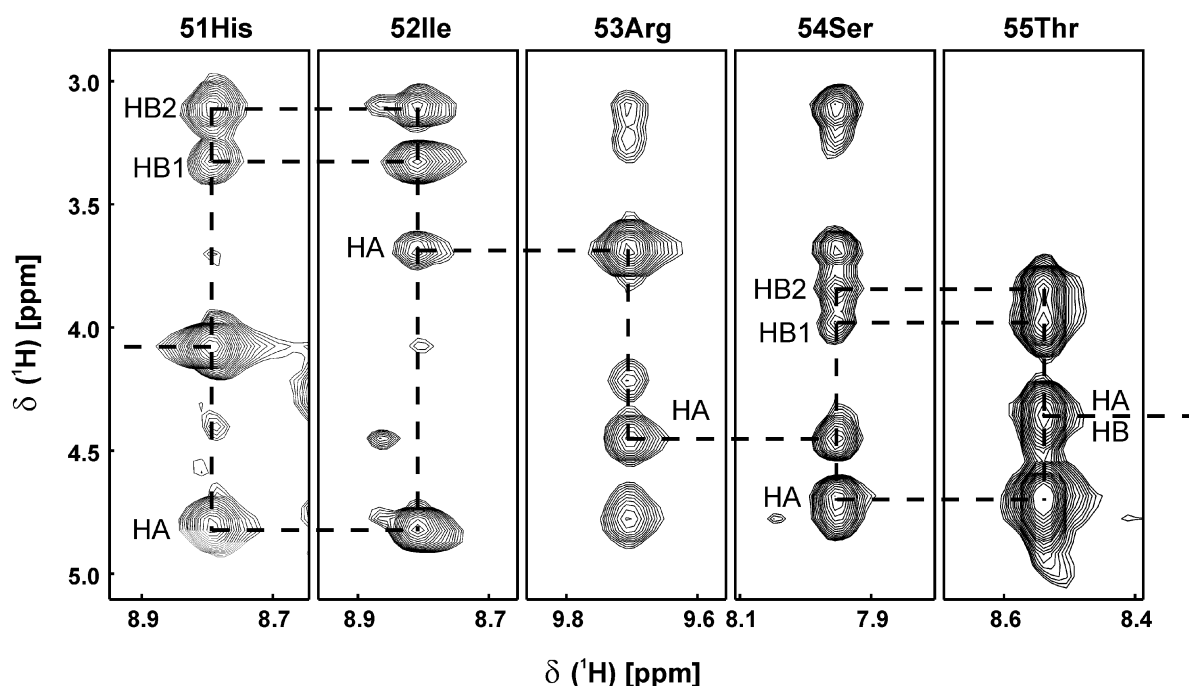


Abb. 4.18: Illustration der sequentiellen Zuordnung der NOESY-Stripes mittels *chain tracing* für den Sequenzbereich His51 bis Thr55

Die aus den ^{15}N -editierten 3D-NOESY-Spektren streifenartig extrahierten NOESY-Signalleitern werden mit Hilfe von eindeutig sequentiellen NOEs entsprechend der Aminosäuresequenz nebeneinander angeordnet, so dass einer „Spur“ aus interresidualen und intraresidualen NOEs (— — —) entlang Primärsequenz gefolgt werden kann.

Zwar konnten auf diese Weise ein großer Teil der Resonanzen (vor allem des Proteinerückgrates) zugeordnet werden, dennoch reichte der Informationsgehalt der ^{15}N -editierten Spektren zum Auflösen der Mehrdeutigkeiten insbesondere der Resonanzen der Seitenkettenprotonen, wie es für die Berechnung einer hochaufgelösten Struktur notwendig ist, nicht aus. Auch die homonuklearen 2D-Experimente boten hierzu wegen des starken spektralen Überlapps (Kap. 4.7.1.2) keine weitere Hilfestellung.

4.6.1.5 Vervollständigung der Zuordnung mit Hilfe von GPdom15kurz-Spektren

Nachdem die Analyse nach Wishart (Kap. 3.15.5.2) der zu diesem Zeitpunkt nahezu vollständig zugeordneten $\text{H}\alpha$ -Resonanzen für den 15 Aminosäuren umfassenden Bereich des COOH-Terminus keine Hinweise auf das Vorliegen einer regulären Sekundärstruktur ergab (vgl. Abb. 4.22, Kap. 4.6.2) und daher für eine COOH-terminal verkürzte GPdom15-Variante eine deutliche Entzerrung der Spektren zu erwarten war, wurde eine nur die Aminosäuren Asp1 bis Glu59 umspannende Domäne 15-Variante, GPdom15kurz, hergestellt (Kap. 4.1.2.).

Die homonuklearen Spektren von GPdom15kurz zeigen gegenüber denen von GPdom15 erwartungsgemäß eine deutlich geringere Signaldichte, besonders im Bereich von 8,6 bis 7,8 ppm bei sonst nahezu identischen Verschiebungen (Abb. 4.19). Dies und die Tatsache, dass auch sämtliche NOE-Muster der Aminosäuren von GPdom15kurz mit den entsprechenden Resten von GPdom15 exakt übereinstimmen, belegen das Vorliegen einer identischen Tertiärstruktur für den gemeinsamen Sequenzbereich von GPdom15 und GPdom15kurz.

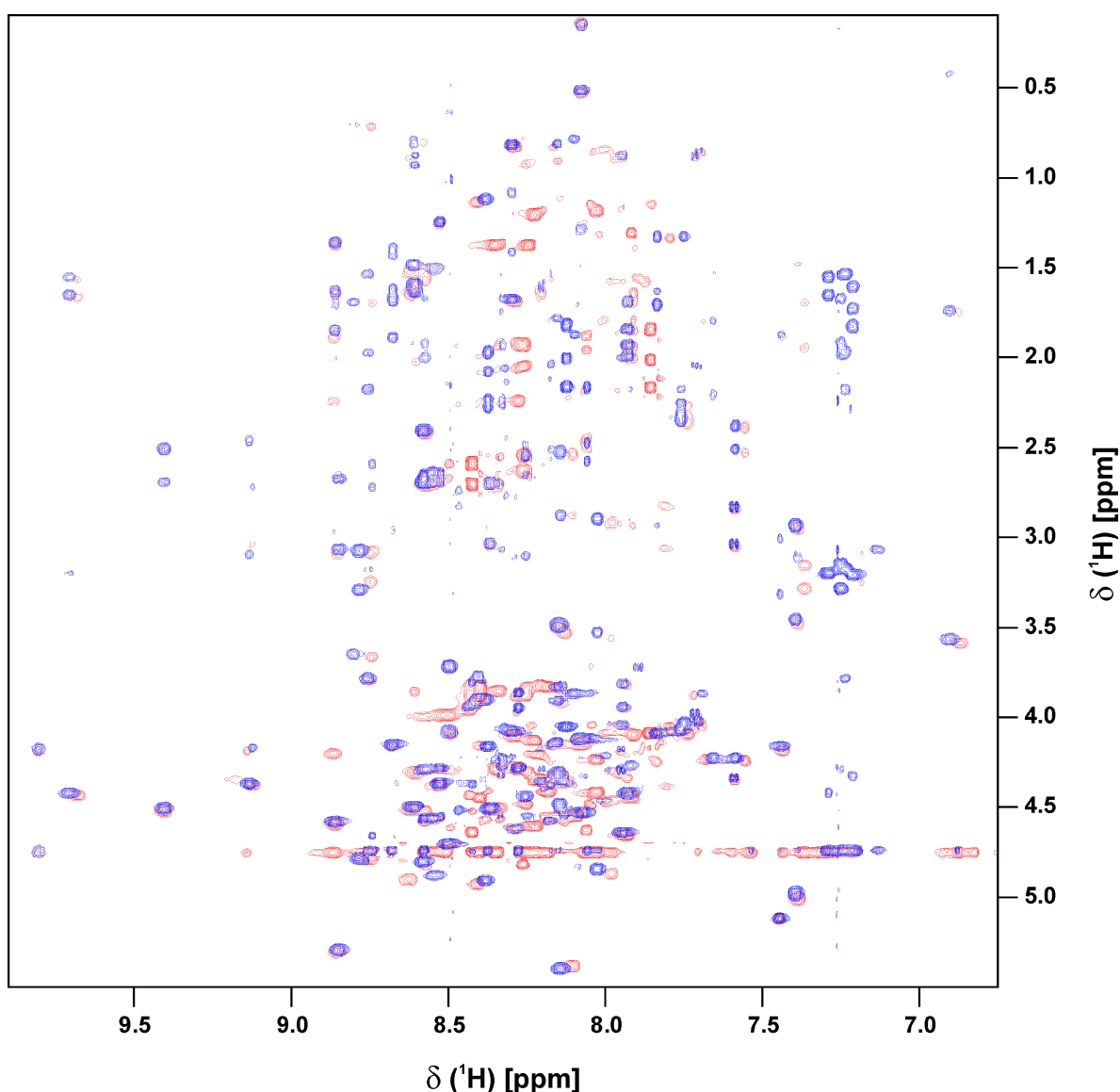


Abb. 4.19: Ausschnitt aus den übereinander projizierten TOCSY-Spektren von GPdom15kurz und GPdom15

Bereich der Kreuzresonanzen zwischen Amid- und Seitenkettenprotonen als Konturplot; TOCSY-Signale von GPdom15 sind rot, die von GPdom15kurz blau eingefärbt; GPdom15 und GPdom15kurz (Probe B bzw. G, Tab. 3.5, Kap. 3.15.3); Aufnahmeparameter wie in Tab. 3.4 (Kap. 3.15.3) aufgeführt.

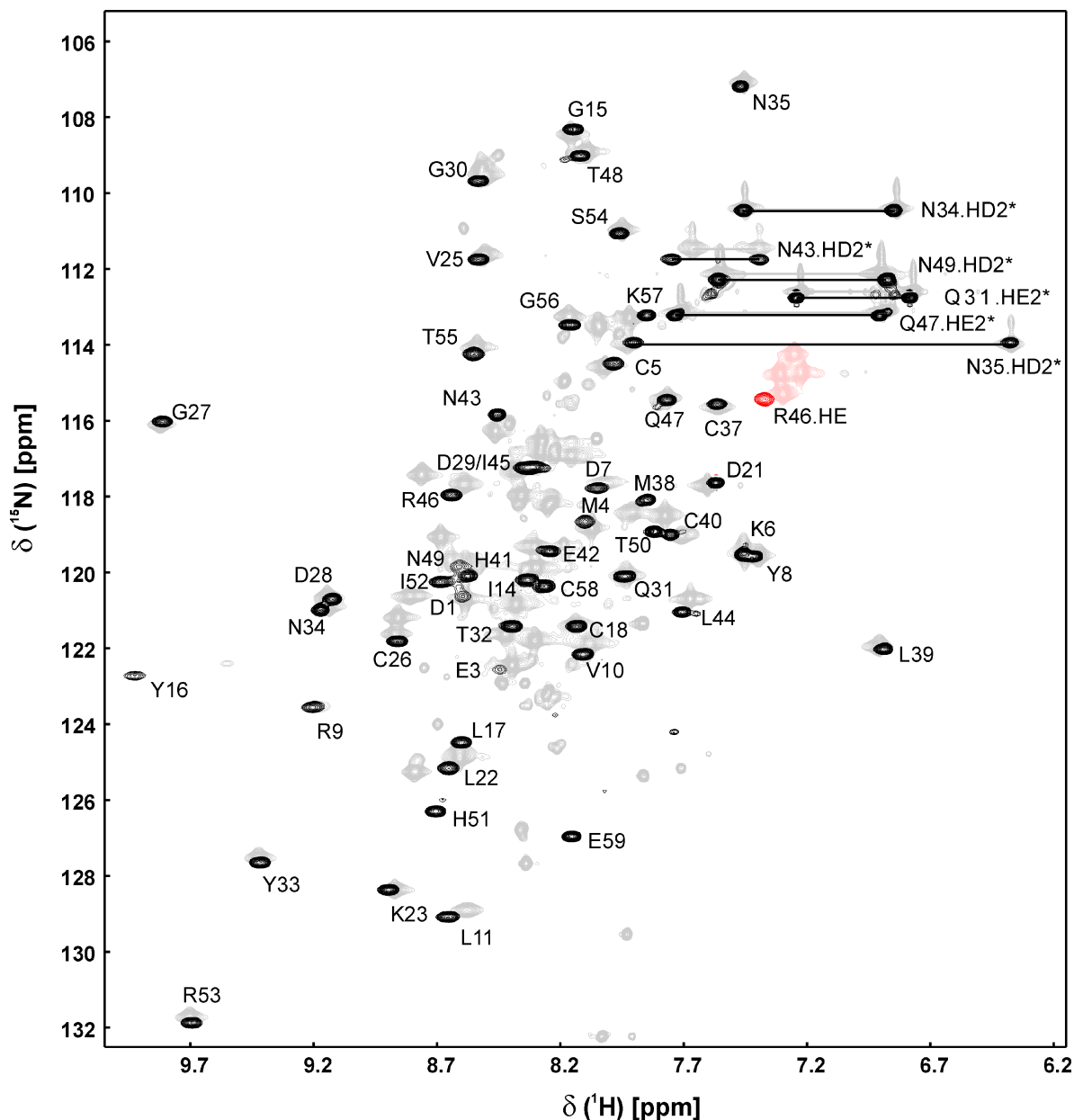


Abb. 4.20: Überlagerung der ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren von ^{15}N -GPdom15kurz und ^{15}N -GPdom15 unter Angabe der für ^{15}N -GPdom15kurz getroffenen Zuordnung

Signale für GPdom15kurz sind schwarz, das gefaltete ϵNH -Signal der Seitenkette von Arg16 ist rot und Signale für GPdom15 sind grau, bzw. ϵNH -Signale der Arg-Seitenketten rot eingefärbt; die zusammengehörigen γNH_2 -, bzw. δNH_2 -Resonanzen der Seitenketten von Asparagin und Glutamin sind mit einer Linie verbunden; ^{15}N -GPdom15kurz (Probe G, Tab. 3.5, Kap. 3.15.3); ^{15}N -GPdom15 (Probe D, Tab. 3.5, Kap. 3.15.3); Aufnahmeparameter wie in Tab. 3.4 (Kap. 3.15.3) aufgeführt; ppm-Werte auf DSS als externen Standard bezogen bzw. indirekt über das Frequenz-Verhältnis ($\omega_{\text{N}} / \omega_{\text{H}} = 0,101329118$; Markley *et al.*, 1998) geeicht.

Trotzdem war es aufgrund der bereits für GPdom15 beschriebenen Problematik der Signalüberlagerungen (vgl. Kap. 4.6.1.2, z.B. für Lys23, Cys26 und Glu59) notwendig, auch von der verkürzten Variante ^{15}N -editierte 3D-Spektren aufzunehmen. Der pH-Wert der ^{15}N -markierten Probe lag nach Lösen in 20 mM Kalium-Phosphat-Puffer mit 6,8 sehr nahe am theore-

tischen pI-Wert von 6,89 (Bjellqvist *et al.*, 1993; Bjellqvist *et al.*, 1994; Wilkins *et al.*, 1998). Dies hatte zwar keine feststellbaren negativen Auswirkungen auf die Löslichkeit, für einige Aminosäuren aber wurden in den Spektren keine Resonanzsignale beobachtet (Abb. 4.20). So wurden für Arg13, Lys20 und Asn49 weder im ^1H , ^{15}N -HSQC-Spektrum noch in den 3D-Aufnahmen Signale detektiert. Außerdem wurde auch nur eine (für Arg46) von vier erwarteten Resonanzen für die ϵNH -Seitenkettenprotonen der vier Arginine erhalten, was auf einen bei diesem pH-Wert stärkeren Austausch der betreffenden Protonen mit denen des Lösungsmittels zurückgeführt wurde. Ein positiver Nebeneffekt des etwas höheren pH-Wertes war eine nun unterscheidbare Frequenz für die beiden Leucine 17 und 22, was entsprechend aufgetrennte NOESY-Leitern in den 3D-Spektren zur Folge hatte. Auch für Tyr16 und Arg9 wurden deutlich intensivere Resonanzen als in den Spektren von GPdom15 und damit verwertbare TOCSY- und NOESY-Signale erhalten. Bis auf Tyr16, für das eine Verschiebung des $\delta(^1\text{H})\text{HN}$ -Wertes um 0,4 ppm in Richtung tieferes Feld beobachtet wurde, und His51, das eine rund 1 ppm höhere ^{15}N -Frequenz aufwies, sowie Glu59, nun als COOH-terminale Aminosäure mit gänzlich anderen Resonanzfrequenzen, waren sonst nur sehr geringe Unterschiede zu den Verschiebungen von ^{15}N -GPdom15 feststellbar. Auch die Übereinstimmung der 3D-Spektren von ^{15}N -GPdom15kurz und der unverkürzten Variante hinsichtlich des NOE-

Musters der entsprechenden Reste, wie stellvertretend für Val25 in Ab. 4.21 wiedergegeben, war wiederum ein Beleg für das Vorliegen einer identischen Tertiärstruktur für den gemeinsamen Sequenzbereich.

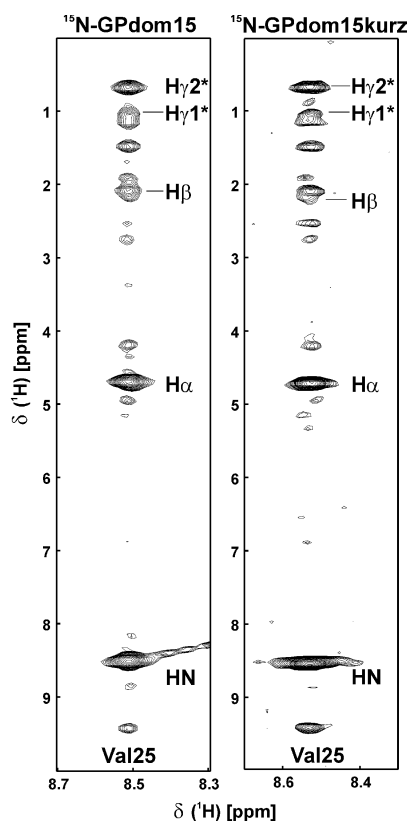


Abb. 4.21: NOE-Muster für Val25 in den ^{15}N -NOESY-HSQC-Spektren von ^{15}N -GPdom15 und ^{15}N -GPdom15kurz

^{15}N -GPdom15kurz (Probe G, Tab. 3.5, Kap. 3.15.3); ^{15}N -GPdom15 (Probe D, Tab. 3.5, Kap. 3.15.3); Aufnahmeparameter wie in Tab. 3.4 (Kap. 3.15.3) aufgeführt.

Ebenso wie für GPdom15 fanden sich auch in keinem der Spektren von GPdom15kurz Hinweise auf konformationelle Heterogenität oder für Wechselwirkungen der durch die PreScission-Schnittstelle bedingten zusätzlichen NH₂-terminalen Gly-Pro-Sequenz mit den übrigen Bereichen des Proteins. Nachdem die Tertiärstruktur von GPdom15 und GPdom15kurz (für den gemeinsamen Sequenzbereich) als identisch angenommen werden konnte, konnten die homonuklearen und ¹⁵N-editierten Spektren der COOH-terminal verkürzten Variante zur Vervollständigung der Zuordnung der Resonanzen von GPdom15, und umgekehrt die von GPdom15 zur Ergänzung unvollständig zugeordneter Signale von GPdom15kurz verwendet werden. Die Verschiebungslisten sind im Anhang (Kap. 10.2) aufgeführt und in der BMRB-Datenbank (*Biological Magnetic Resonance Data Bank*; <http://www.bmrb.wisc.edu>) unter den Zugriffsnummern 6179 (GPdom15kurz) und 6180 (GPdom15) hinterlegt.

4.6.2 Informationen über die sequenzspezifische Sekundärstruktur - CSI

Bereits ohne Strukturrechnung lassen sich mit Hilfe der chemischen Verschiebungen, z.B. der H α -Kerne, erste sequenzspezifische Informationen über das Vorliegen von Sekundärstrukturelementen ableiten (Kap. 3.15.5.2). Hierzu wird für jede Aminosäure ein chemischer Verschiebungsindex (*chemical shift index*, CSI) aus der Differenz der chemischen Verschiebung im vorliegenden Protein und dem entsprechenden Wert in unstrukturierten Peptiden für die jeweilige Sequenzposition nach den in Kap. 3.15.5.2. beschriebenen Kriterien erstellt. Nachdem für Cysteine im oxidierten Zustand, denen in der Sequenz ein Prolin folgt, in der entsprechenden Literatur (Wishart *et al.*, 1995) kein Referenzwert angegeben ist, wurde zur Ableitung des CSI von GPdom15 bzw. GPdom15kurz der gleiche Unterschied zu einem Cystein im reduzierten Zustand angenommen, wie er sich für oxidierte und reduzierte Cysteine vor Alaninen ergibt ($\Delta\delta_{\text{rc}}(^1\text{H}) = 0,18$ ppm), und Cys18 auf einen Referenzwert von 4,97 ppm bezogen. Mit einem $\delta(^1\text{H})\text{H}\alpha$ -Wert von 5,4 ppm wirkt sich dies aber nur auf die absolute Differenz, wie in Abb. 4.22 b gezeigt, nicht aber auf die Klassifizierung von Cys18 (+1) aus.

Aufgrund der nur sehr geringen Unterschiede der H α -Verschiebungen (Abb. 4.22 b) ergibt sich für den gemeinsamen Bereich von GPdom15 und GPdom15kurz ein nahezu identischer CSI, der in Abb. 4.22 a wiedergegeben ist. Lediglich für GPdom15kurz wird gegenüber GPdom15 ein um 0,11 ppm zu höherem Feld verschobener H α -Wert für Glu3 beobachtet, wodurch der Unterschied zum Referenzwert unter die Bewertungsgrenze von 0,1 ppm fällt, während umgekehrt für GPdom15kurz der H α -Wert von Gly15 nun knapp darüber liegt.

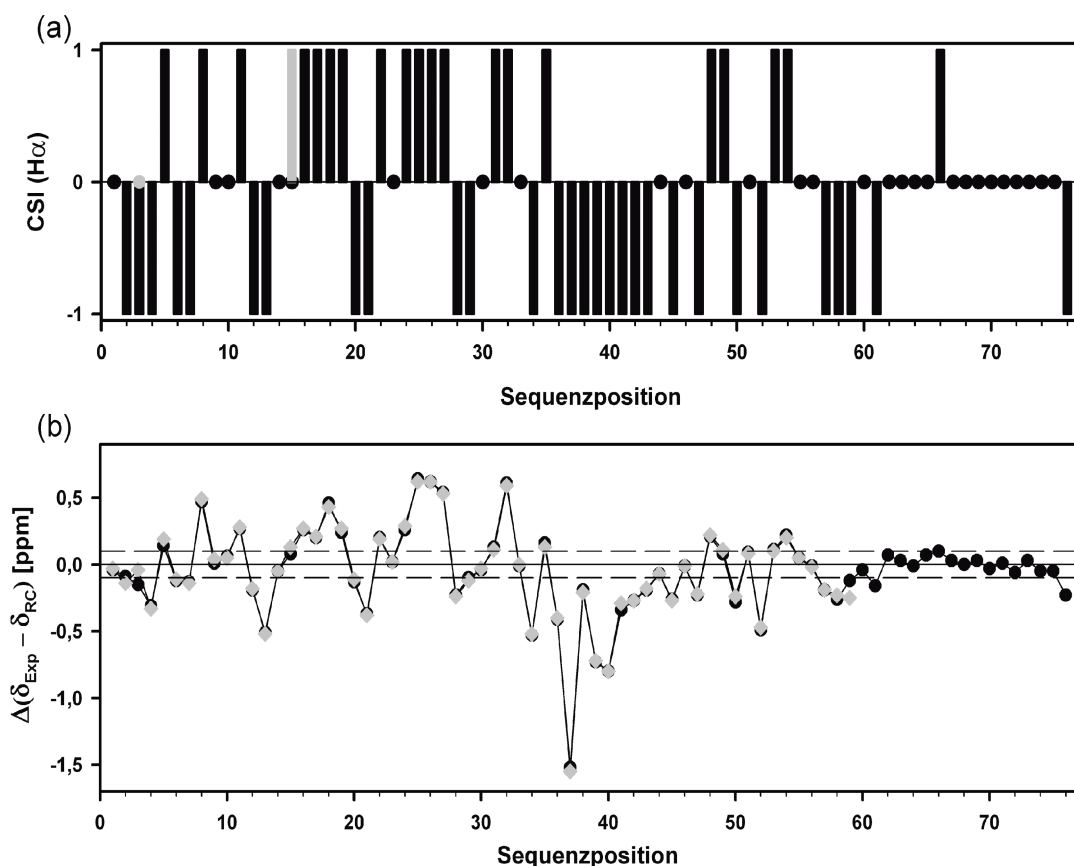


Abb. 4.22: Chemischer Verschiebungsindex (CSI) (a) und Übersicht über die sekundären chemischen Verschiebungen von GPdom15 und GPdom15kurz (b)

(a) CSI von GPdom15 schwarz, abweichende Indices für GPdom15kurz grau eingefärbt, ein CSI-Wert von Null ist als Kreis dargestellt; (b) sekundäre chemische Verschiebung von GPdom15kurz (◆), bzw. und GPdom15 (●); Nulllinie sowie Bewertungsgrenzen von $+0,1$ und $-0,1$ ppm sind eingezeichnet.

Die Analyse des CSI (Kap. 3.15.5.2) lässt für die Sequenzbereiche Ser2 bis Cys5, Pro36 bis Gln47, darunter Cys37 mit einem extrem hochfeldverschobenen H_{α} -Signal (vgl. Kap. 4.6.8), sowie Lys57 bis Ser61 eine α -helikale Struktur erwarten. Währenddessen ist für die Abschnitte Gly15 bis Pro19 und Leu22 bis Gly27 das Vorliegen eines β -Faltblattes anzunehmen. Nur zwei positive Indices mit einem neutralen Wert in Folge, wie für die Sequenzbereiche Gln31 bis Tyr33 sowie Arg53 bis Thr55, lassen den Kriterien nach keinen Rückschluss auf die Ausbildung einer Faltblattstruktur zu (Wishart *et al.*, 1992), eine Tendenz zu einer gestreckten Konformation ist aber anzunehmen. Den nur geringen Unterschieden zu den *random coil*-Werten nach sollte der die 15 COOH-terminalen Aminosäuren umfassende Bereich von GPdom15 keinerlei Ausbildung regulärer Sekundärstrukturelemente zeigen.

4.6.3 Experimentelle Strukturinformationen

4.6.3.1 Einschränkung der Diederwinkel durch $^3\text{J}(\text{HN}, \text{H}\alpha)$ -Kopplungskonstanten

Zur Erfassung der Größe der Kopplungskonstante $^3\text{J}(\text{HN}, \text{H}\alpha)$, die gemäß der Karplus-Beziehung mit dem Diederwinkel Φ des Proteinrückgrates korreliert (Karplus, 1959; Pardi *et al.*, 1984; Kap. 3.16.2.2) und daher zur Einschränkung des dihedralen Winkels der jeweiligen Aminosäure für die spätere Strukturberechnung verwendet werden kann, wurden die HNHA- und COSY-Spektren entsprechend analysiert (Kap. 3.16.2.2). Auf diese Weise konnte für insgesamt 41 Aminosäuren (bei denen es sich weder um Prolin noch um Glycin handelte und die auch keine Signalüberlagerungen zeigten) die Größe der Kopplung bestimmt werden (Abb. 4.23). Einen für α -helikale Bereiche charakteristischen Wert kleiner als 6 Hz wiesen 16 Reste auf und für 13 wurde eine Kopplung größer als 8 Hz, wie sie typischerweise in β -Faltblattsträngen zu beobachten ist, gefunden. Für die übrigen 12 Aminosäuren lagen die Kopplungskonstanten im Bereich zwischen 6 und 8 Hz und wurden daher nicht für eine Beschränkung des Diederwinkels eingesetzt.

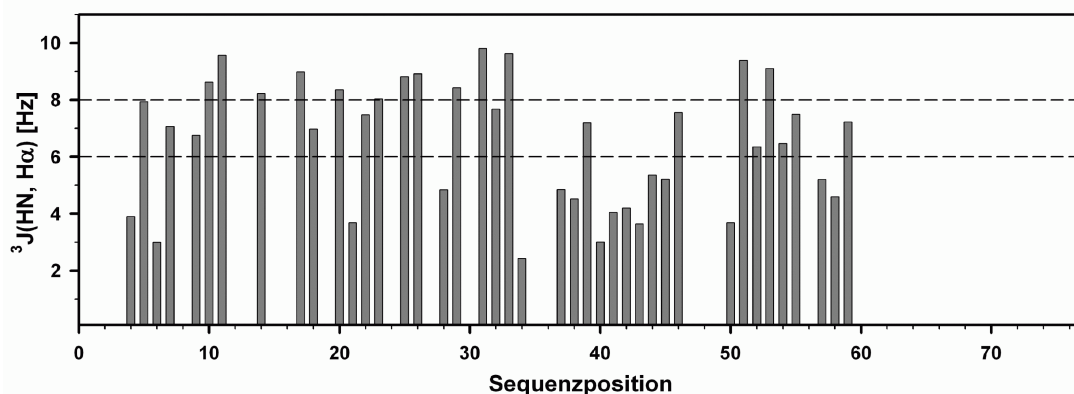


Abb. 4.23: Sequenzspezifische Auftragung der ermittelten Kopplungskonstanten $^3\text{J}(\text{HN}, \text{H}\alpha)$

Werte größer 8 Hz sind für Faltblattstränge, Werte kleiner 6 Hz für helikale Strukturen charakteristisch.

4.6.3.2 Identifizierung von Wasserstoffbrücken

Aus dem Austauschverhalten von Amidprotonen mit den Protonen des Lösungsmittels kann auf das Vorliegen regulärer Sekundärstrukturelemente geschlossen werden, da diese Bereiche durch Wasserstoffbrückenbindung stabilisiert werden und daher für beteiligte Amidprotonen meist ein verlangsamter Austausch zu beobachten ist (Kap. 3.16.2.3, 4.6.1.3). Zur Identifizierung von langsam austauschenden Amidprotonen wurde lyophilisiertes ^{15}N -markiertes GPdom15-Protein (Probe D, Tab. 3.5, Kap. 3.15.3) in reinem D_2O gelöst und umgehend eine Serie von $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC-Experimenten durchgeführt (Kap. 3.15.3). Die Amidprotonen von

Met4, Val25, Cys26, Gly27, Asp28, Asp29, Gly30, Gln31, Tyr33, Asn35, Met38, Leu39, Cys40, Asn43, Leu44, Ile45, Arg46 und Arg53 zeigten 120 min nach dem Lösen noch ein detektierbares Signal (in Abb. 4.17 in blau dargestellt) und wurden daher als potentielle Donoren einer Wasserstoffbrückenbindung angenommen. Während der iterativen Strukturrechnung konnte in 14 Fällen der Akzeptor, der die beschriebenen Kriterien erfüllte (Kap. 3.16.2.3), eindeutig identifiziert werden und daraus eine entsprechende Abstandsbeschränkung abgeleitet werden (Anhang, Kap. 10.3.4). Für das Amidproton von Leu44 wurden dabei 2 Akzeptoren, jeweils der Carbonyl-Sauerstoff von Cys40 und His41, gefunden. Für GPdom15kurz sind die Abstände ebenfalls erfüllt, so dass diese Vorgaben bei den abschließenden Strukturrechnungen mit berücksichtigt wurden.

4.6.3.3 Abstandsbeschränkungen aus NOE-Kreuzresonanzen

Nachdem die Intensität der beobachteten NOE-Signale der inversen sechsten Potenz der Distanz der Kopplungspartner proportional ist, kann aus der Stärke der NOE-Kreuzresonanzen der Abstand der koppelnden Kerne abgeleitet werden (Kap. 3.16.2.1). Da Frequenzdegenerationen oder Signalüberlagerungen eine sofortige eindeutige Zuordnung der NOE-Signale oftmals verhindern, erfolgt das Auffinden des Kopplungspartners meist in einem iterativen Prozess (Kap. 3.16.2.1). Bei der sukzessiven Zuordnung der Kreuzresonanzen der 3D-Spektren von GPdom15 und GPdom15kurz dienten die homonuklearen NOESY-Aufnahmen vor allem zum Auflösen von Mehrdeutigkeiten sowie zur Ableitung von Abstandsbeschränkungen zwischen Seitenkettenprotonen, die mit Aufnahmen ^{15}N -editierter Spektren nicht zugänglich sind. Hierzu wurde auch ein NOESY-Experiment mit in D_2O gelöstem GPdom15kurz durchgeführt (Probe F, Tab. 3.5, Kap. 3.15.3), um die Kreuzresonanzen zwischen den $\text{H}\alpha$ -Protonen untereinander bzw. zu den Seitenkettenprotonen beobachten zu können, die nahe dem Wassersignal liegend aufgrund der Wasserunterdrückung nur ungenügend intensiv erscheinen bzw. aufgrund der Überlappung mit dem Wassersignal nicht eindeutig identifiziert werden können. Abb. 4.24 gibt eine Überlagerung des entsprechenden Spektrums mit einer NOESY-Aufnahme derselben in Wasser gelösten Probe wieder.

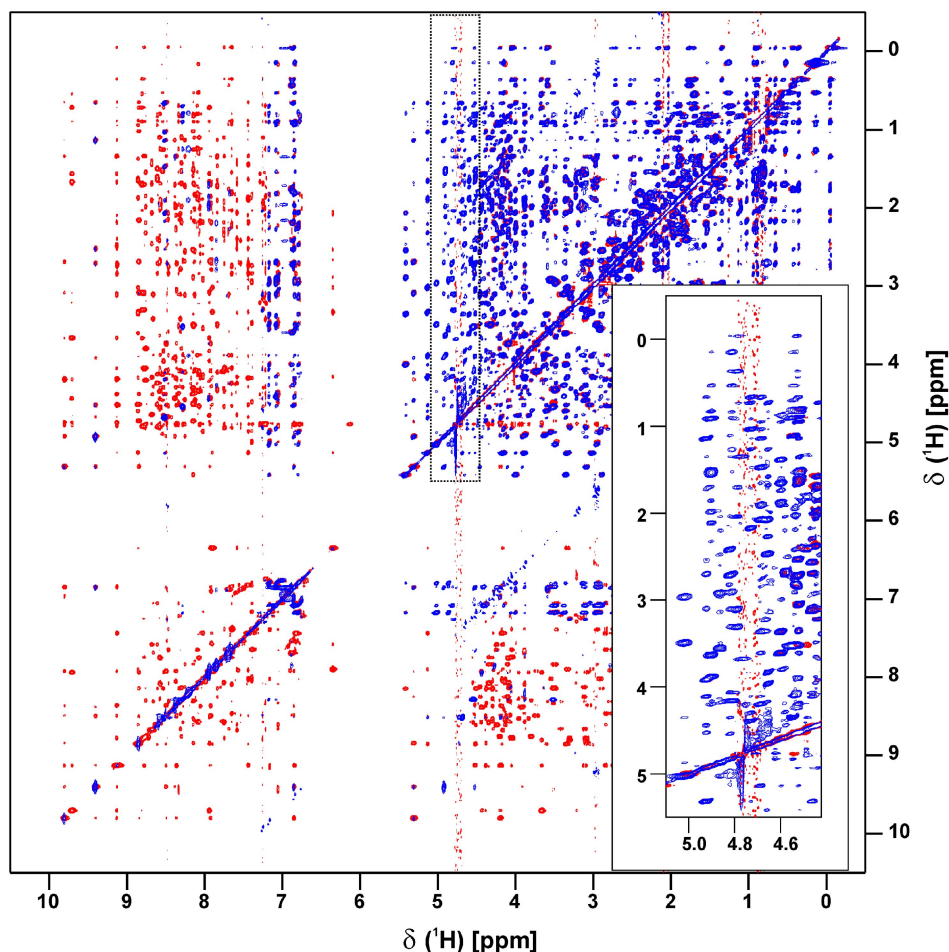


Abb. 4.24: Überlagerung der homonuklearen 2D-NOESY-Spektren von GPdom15kurz in H_2O und D_2O

Signale von GPdom15kurz in H_2O sind in rot, der in D_2O gelösten Probe in blau dargestellt (Proben E und F, Tab. 3.5, Kap. 3.15.3); der Bereich des vergrößerten Ausschnittes ist durch gepunkteten Rahmen gekennzeichnet; Aufnahmeparameter wie in Tab. 3.4 (Kap. 3.15.3) aufgeführt.

Die Auswertung der sequentiellen und mittelweitreichenden Kontakte (Wüthrich, 1986) lässt für die Bereiche Ser2 bis Asp7 sowie Pro36 bis Gln47 die Ausbildung einer α -helikalen Struktur vermuten, da hier die für α -Helices charakteristischen starken NOEs vom Typ $\text{H}\alpha_{(i)}\text{H}\beta_{(i+3)}$ und $\text{HN}_{(i)}\text{HN}_{(i+1)}$, (Abb. 4.25) bzw. für den zweiten Abschnitt außerdem Kontakte der Art $\text{H}\alpha_{(i)}\text{HN}_{(i+4)}$ beobachtet werden. Das Auftreten von starken $\text{H}\alpha_{(i)}\text{HN}_{(i+1)}$ - bei gleichzeitig schwächeren $\text{HN}_{(i)}\text{HN}_{(i+1)}$ -Kreuzresonanzen ist für Faltblattstrukturen üblich und wird für die Sequenzabschnitte Tyr16 bis Pro19, Leu22 bis Gly27, Gln31 bis Tyr33 sowie Arg53 bis Thr55 gefunden, wobei die beiden Faltblattbereiche Leu22 bis Gly27 und Gln31 bis Tyr33 wohl durch eine Schleife (*turn*) getrennt sind, da hier starke NOEs der Art $\text{H}\alpha_{(i)}\text{HN}_{(i+2)}$ festgestellt werden (Wüthrich, 1986).

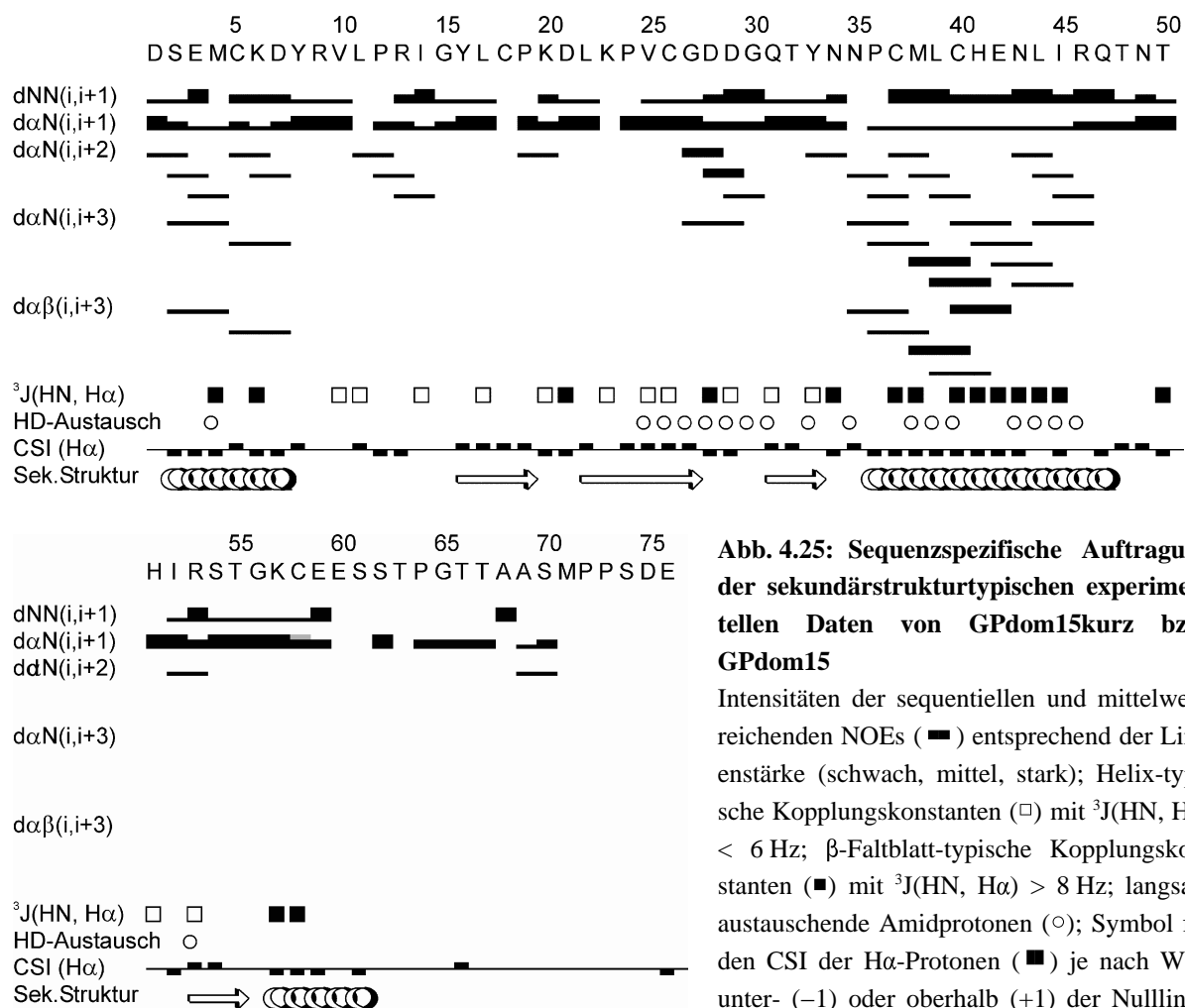


Abb. 4.25: Sequenzspezifische Auftragung der sekundärstrukturtypischen experimentellen Daten von GPdom15kurz bzw. GPdom15

Intensitäten der sequentiellen und mittelweitreichenden NOEs (■) entsprechend der Liniestärke (schwach, mittel, stark); Helix-typische Kopplungskonstanten (□) mit $^3J(\text{HN}, \text{H}\alpha) < 6 \text{ Hz}$; β -Faltblatt-typische Kopplungskonstanten (■) mit $^3J(\text{HN}, \text{H}\alpha) > 8 \text{ Hz}$; langsam austauschende Amidprotonen (○); Symbol für den CSI der $\text{H}\alpha$ -Protonen (■) je nach Wert unter- (−1) oder oberhalb (+1) der Nulllinie; abgeleitete Sekundärstrukturelemente entsprechen im Wesentlichen denen aus der Strukturberechnung erhaltenen.

Für den anhand von CSI und Kopplungskonstanten als helikal eingestuften Abschnitt Lys57 bis Ser61 von GPdom15 werden ebenso wie für die anderen Bereiche mit abgeleiteten regulären Sekundärstrukturelementen (bis auf den Abschnitt Tyr16 bis Pro19) langsam austauschende Amidprotonen beobachtet. Die durch Analyse der chemischen Verschiebungen abgeleiteten Informationen zur Sekundärstruktur (Kap. 4.6.2) werden damit weitestgehend bestätigt.

4.6.3.4 Analyse der NOE-Kreuzresonanzen

Bei einer sequenzspezifischen Auftragung sämtlicher interresidualer NOEs gegen die Sequenzpositionen der jeweiligen Kopplungspartner in Form einer NOE-Kontaktkarte für GPdom15 (Abb. 4.26) entspricht ein Symbol mindestens einer beobachteten Kreuzresonanz zwischen den jeweiligen Aminosäureresten. Diese Darstellung erlaubt u.a. einen schnellen

Überblick über die Verteilung und Lage weitreichender und damit tertiärstrukturbestimmender Kontakte, die aufgrund des größeren Unterschiedes der Sequenzpositionen entsprechend weiter von der Diagonalen entfernt liegen. Die für α -helikale Bereiche charakteristischen mittelweitreichenden NOEs spiegeln sich in Form von Parallelen mit einem Abstand von zwei bis vier Sequenzpositionen zur Diagonalen wider, weshalb für die Sequenzabschnitte Ser2 bis Asp7 und Pro36 bis Gln47 von GPdom15 die Ausbildung einer Helix anzunehmen ist. Für die COOH-terminale Helix (Lys57-Ser61) hingegen ergeben sich nur schwache Anzeichen (Abb. 4.26).

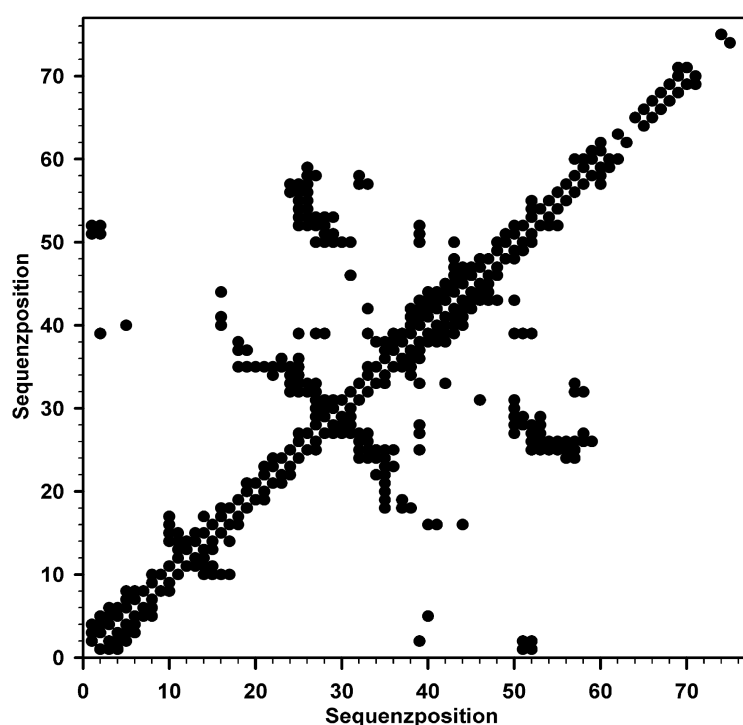


Abb. 4.26: NOE-Kontaktkarte für GPdom15

Sequenzspezifische Auftragung der interresidualen NOEs gegen die Sequenzpositionen der jeweiligen Kopplungspartner; ein Kreis symbolisiert mindestens eine beobachtete Kreuzresonanz zwischen den jeweiligen Aminosäureresten.

Kontakte zwischen antiparallelen β -Faltblattsträngen führen zu einem orthogonal zur Diagonalen angeordneten Symbolmuster, das meist in der direkten Nähe der Diagonalen liegt, wenn benachbarte Faltblattstränge auch in der Sequenz aufeinander folgen. Somit sollte der Bereich Val10 bis Leu17 eine kurze Faltblatt-artige Anordnung zeigen und ein dreisträngiges antiparalleles Faltblatt mit Beteiligung der Aminosäuren Val25 bis Gly27, Gln31 bis Tyr33 und Ile52 bis Thr55 ausgebildet sein, was aus den Kontakten zwischen Leu11 und Gly15, sowie aus den Kontakten zwischen Gly27 und Gln31, bzw. Arg53 sowie zwischen Val25 und Tyr33, bzw. Thr55 bei gleichzeitigem Fehlen von NOEs z.B. zwischen Gln31 und Arg53 geschlossen werden kann. Ferner kann abgeleitet werden, dass der NH_2 -Terminus in Richtung der längeren Helix orientiert ist (Ser2 zu Leu39 und Ile52). Die Ergebnisse der Analyse der sekundärstrukturtypischen experimentellen Daten (Kap. 4.6.3.3) werden damit bis auf das

Vorliegen der Faltblatt-artigen Struktur für die Abschnitte Tyr16 bis Pro19 und Leu22 bis Gly25, für die dann eine gestreckte Rückgratkonformation zu erwarten ist, weitestgehend bestätigt.

4.6.4 Die Prolinkonformation

Nach der Translation liegen die Peptidbindungen normalerweise in der *trans*-Form vor (Ramachandran & Sasisekharan, 1968). Nur für Prolin wird zu etwa 5 % eine *cis* Xaa-Pro Bindung beobachtet (Xaa = beliebige Aminosäure), wobei eine spontane Isomerisierung aufgrund des partiellen Doppelbindungscharakters der Peptidbindung nur sehr langsam verläuft (Energiebarriere ca. 18 kcal/mol; z.B. Fischer *et al.*, 1994). Da bereits bei der Berechnung der geometrisch korrekten Startstrukturen (Kap. 3.16.3.1) die jeweilige Konformation sämtlicher Proline vorgegeben werden muss, ist es für die Strukturrechnung Prolin-haltiger Proteine wichtig, die Konformation aller Proline zu kennen.

Wegen des deutlich unterschiedlichen Abstandes zwischen den Protonen $\text{HN}_{(\text{Pro-1})}$ bzw. $\text{H}\alpha_{(\text{Pro-1})}$ und $\text{H}\delta_{(\text{Pro})}$ bzw. $\text{H}\alpha_{(\text{Pro})}$ bei der *cis*- und *trans*-Form ist die Konformationsbestimmung von Prolinen anhand charakteristischer NOE-Signale möglich (Wüthrich, 1986). So kann bei Auftreten von $\text{HN}_{(\text{Pro-1})}\text{H}\delta_{(\text{Pro})}$ - und $\text{H}\alpha_{(\text{Pro-1})}\text{H}\delta_{(\text{Pro})}$ -NOE-Kreuzresonanzen bei gleichzeitigem Fehlen der für *cis*-Prolin charakteristischen $\text{HN}_{(\text{Pro-1})}\text{H}\alpha_{(\text{Pro})}$ - und $\text{H}\alpha_{(\text{Pro-1})}\text{H}\alpha_{(\text{Pro})}$ -NOE-Signale auf das Vorliegen von *trans*-Prolin geschlossen werden (Wüthrich, 1986), wie es für alle Proline in allen NOESY-Spektren sowohl für GPdom15 als auch für GPdom15kurz beobachtet wurde.

4.6.5 Das Muster der Disulfidverbrückung von LEKTI-Domäne 15

Eine Möglichkeit, das Muster der Disulfidverbrückung eines Proteins festzustellen, beruht auf den geringen Abständen zwischen den α - und β -Protonen von Cysteinen, wenn diese eine Disulfidbrücke ausbilden, und den damit verbundenen charakteristischen NOE-Kreuzresonanzen in den NMR-Aufnahmen (Klaus *et al.*, 1993). Die homonuklearen NOESY-Spektren wurden daher im Rahmen der Zuordnung der Resonanzen (Kap. 3.15.5.1) auf die Existenz entsprechender NOE-Signale hin analysiert. Ein Sequenzvergleich der LEKTI-Domäne 15 mit einigen Vertretern des Kazaltyps (Abb. 4.27), deren Struktur aufgeklärt wurde, ließ bereits aufgrund des übereinstimmenden Cysteinemusters ($\text{C}_1\text{-x(n)-C}_2\text{-x(7)-C}_3\text{-x(6)-Y-x(3)-C}_4\text{-x(2,3)-C}_5\text{-x(m)-C}_6$) die Kazal-artige $\text{C}_1\text{-C}_5/\text{C}_2\text{-C}_4/\text{C}_3\text{-C}_6$ -Verbrückung (Greene & Bartlet, 1969; Lasowski & Kato, 1980) vermuten.

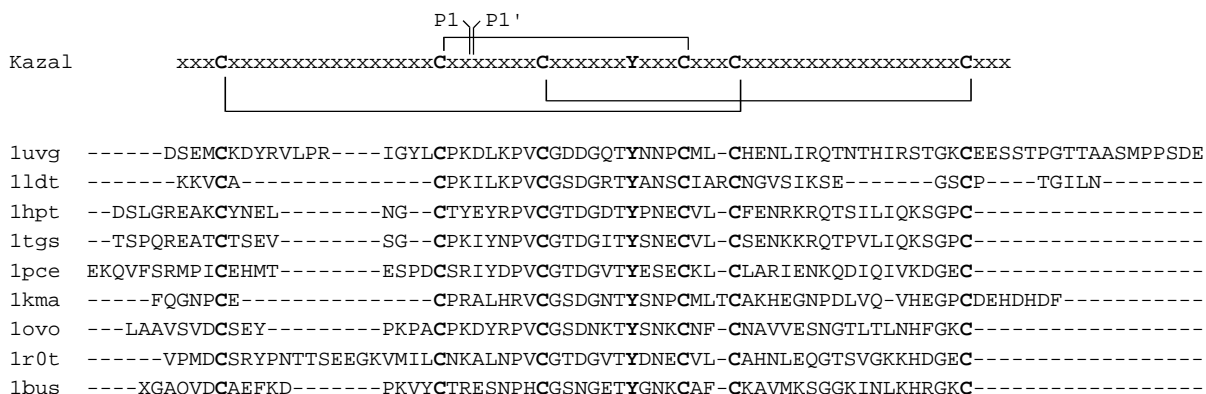


Abb. 4.27: Sequenzvergleich der 15. LEKTI-Domäne mit einer Auswahl von Kazalvertretern und schematische Darstellung des Kazal-typischen Cystein- und Verbrückungsmusters

Vertreter des Kazaltyps weisen das Cysteinmuster $C_1-x(n)-C_2-x(7)-C_3-x(6)-Y-x(3)-C_4-x(2,3)-C_5-x(m)-C_6$ bei einer $C_1-C_5/C_2-C_4/C_3-C_6$ -Verbrückung auf (Greene & Bartlet, 1969; Laskowski & Kato, 1980); der Sequenzvergleich wurde mit ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) erstellt; Position der P1-P1'-Reste (Nomenklatur nach Schechter & Berger, 1967) ist gekennzeichnet; angegebene Sequenzen wie in der Proteindatenbank (<http://www.rcsb.org/pdb>; Berman *et al.*, 2000) hinterlegt; l1dt: Tryptase-Inhibitor aus Blutegel (*Hirudo medicinalis*; Stubbs *et al.*, 1997); l1hpt: Trypsin-Inhibitor aus Bauchspeicheldrüse vom Mensch (*Homo sapiens*; Hecht *et al.*, 1991, 1992); l1tgs: Trypsin-Inhibitor aus Bauchspeicheldrüse vom Schwein (*Sus scrofa*; Bolognesi *et al.*, 1982); l1pce: Kazalvertreter ohne inhibitorische Wirkung auf Trypsin aus Schwein (*Sus scrofa*; Liepinsh *et al.*, 1994); l1kma: Thrombininhibitor Dipetalin aus Raubwanze (*Dipetalogaster maximus*; Schlott *et al.*, 2002); l1ovo: 3. Domäne des Ovomucoid-Inhibitors aus Japanwachtel (*Coturnix coturnix japonica*; Papamokos *et al.*, 1982); l1r0t: 2. Domäne des Ovomucoid-Inhibitors aus Truthuhn (*Meleagris gallopavo*; Ibrahim & Patabhi, 2004); l1bus: Proteinase-Inhibitor IIA aus Samenflüssigkeit (*Bos taurus*; Williamson *et al.*, 1985); l1uv: LEKTI-Domäne 15 (GPdom15).

Tab. 4.4: Übersicht über beobachtete NOE-Signale, die die Kazal-typische Disulfidkonnektivität belegen

1 – 5 Konnektivität	2 – 4 Konnektivität	3 – 6 Konnektivität
$H\alpha_{(Cys5)} - H\beta_{2(Cys40)}$	$H\alpha_{(Cys18)} - H\alpha_{(Cys37)}$	$H\alpha_{(Cys26)} - H\alpha_{(Cys58)}$
$H\beta_{1(Cys5)} - H\beta_{1(Cys40)}$	$H\alpha_{(Cys18)} - H\beta_{1(Cys37)}$	$H\alpha_{(Cys26)} - H\beta_{2(Cys58)}$
$H\beta_{2(Cys5)} - H\alpha_{(Cys40)}$	$H\alpha_{(Cys18)} - H\beta_{2(Cys37)}$	$H\beta_{1(Cys26)} - H\alpha_{(Cys58)}$
$H\beta_{2(Cys5)} - H\beta_{1(Cys40)}$		$H\beta_{2(Cys26)} - H\alpha_{(Cys58)}$
$H\beta_{2(Cys5)} - H\beta_{2(Cys40)}$		

Da NOE-Kreuzresonanzen nur zwischen α - und β -Protonen von solchen Cysteinen, die über eine Disulfidbrücke verknüpft sind, zu beobachten sind (Klaus *et al.*, 1993) und in allen homonuklearen NOESY-Spektren, sowohl von GPdom15kurz als auch von GPdom15, derartige NOE-Signale vorhanden sind (Tab. 4.4; vgl. Anhang, Kap. 10.3.1), kann das Vorliegen des Kazal-typischen Disulfidmusters für die 15. LEKTI-Domäne als gesichert betrachtet werden. Die Homogenität der Spektren und das Fehlen derartiger Kreuzsignale zwischen den verschied-

denen Cysteinen untereinander sowie Strukturberechnungen, die auch ohne Vorgabe der Disulfidverbrückung (Kap. 3.16.3.1.; 3.16.3.2; 4.6.7) in der identischen Konnektivität bzw. Strukturierung resultierten, bestätigen ebenfalls das abgeleitete Verbrückungsmuster.

4.6.6 Der heteronukleare $\{^1\text{H}\}^{15}\text{N}$ NOE

In den ^{15}N -editierten NOESY-Spektren von GPdom15 traten vor allem für den NH_2 - und COOH -terminalen Bereich zum Teil intensive Kreuzsignale im Resonanzfrequenzbereich von Wasser auf (Abb. 4.16), die auf schnellen Austausch der Amidprotonen mit dem Lösungsmittel zurückzuführen sind. Dies und die nur sehr geringe Anzahl an NOE-Signalen zusammen mit den fehlenden Anzeichen einer Strukturierung für den rund 15 Aminosäuren umfassenden Abschnitt des COOH -Terminus (Kap. 4.6.2) ließen insbesondere für diese Region eine erhöhte interne Flexibilität des Proteinrückgrates vermuten. Da die Beweglichkeit einzelner Reste durch Messung des heteronuklearen $\{^1\text{H}\}^{15}\text{N}$ NOE abgeleitet werden kann, wurden von ^{15}N -GPdom15 und ^{15}N -GPdom15kurz entsprechende ^1H , ^{15}N -korrelierte Spektren einmal mit und ohne Sättigung der Amidprotonen aufgenommen. Der heteronukleare NOE ergibt sich dann aus dem Verhältnis der Intensitäten der Resonanzsignale des Spektrums mit Sättigung zu den entsprechenden ohne Sättigung (Kap. 3.15.3), wobei der theoretische Wert für Amidgruppen, die keine internen Bewegungen ausführen, bei einer Resonanzfrequenz der ^1H -Kerne von 600,13 MHz 0,83 beträgt und Werte kleiner als 0,6 Kennzeichen einer beträchtlich erhöhten Mobilität der NH-Vektoren auf einer Pico- bis Nanosekunden-Zeitskala darstellen (Kay *et al.*, 1989).

Die Aufschlüsselung der ermittelten Werte nach Sequenzposition ist in Abb. 4.28 wiedergegeben und zeigt für den gemeinsamen Sequenzbereich von GPdom15kurz und GPdom15 eine sehr hohe Übereinstimmung. Lediglich die ersten beiden aminoterminalen Werte von GPdom15kurz korrelieren nicht mit denen von GPdom15, was aber auf die sehr geringe Signalintensität in den entsprechenden Spektren von ^{15}N -GPdom15kurz für diese beiden Reste und den daraus resultierenden großen Fehler zurückgeführt werden kann. Für den Sequenzabschnitt von Val25 bis Glu59 ist eine für ein globuläres Protein mit ausgeprägter Tertiärstruktur charakteristische Einschränkung der internen Flexibilität der NH-Vektoren zu beobachten.

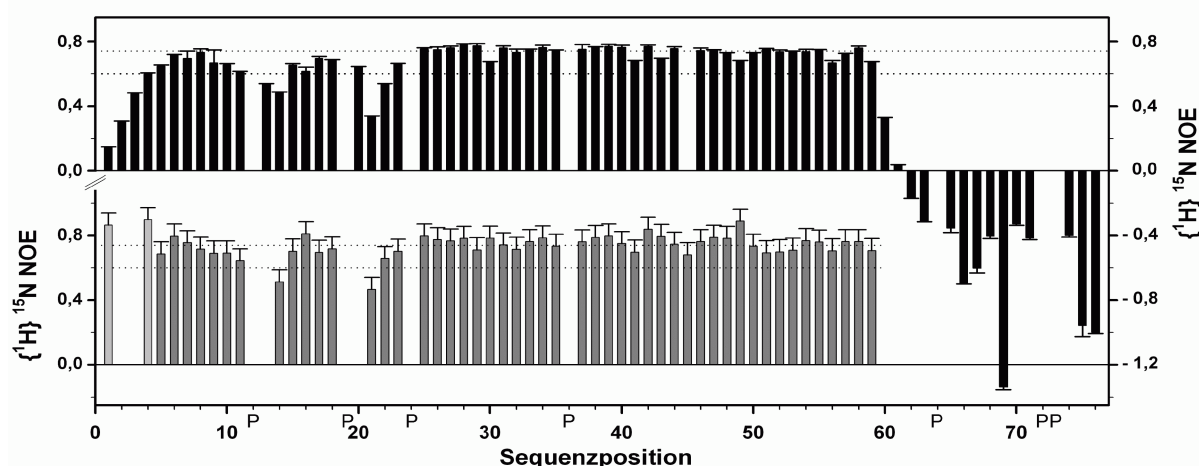


Abb. 4.28: Sequenzspezifische Auftragung des heteronuklearen $\{^1\text{H}\}^{15}\text{N}$ NOE von ^{15}N -GPdom15 und ^{15}N -GPdom15kurz

Sequenzposition mit Angabe der Prolinposition (P); Werte für ^{15}N -GPdom15 aus zwei unabhängigen Experimenten, gemittelt unter Angabe der jeweiligen Standardabweichung in schwarz (obere gepunktete Linie bei 0,74 für den Durchschnittswert des Sequenzabschnittes 25-59) und Werte für ^{15}N -GPdom15kurz aus einem Experiment unter Angabe der Standardabweichung (0,07) bzgl. des Durchschnittswertes (0,76) aller Reste (obere gepunktete Linie) in grau; Werte kleiner als 0,6 (jeweils untere gepunktete Linie) sind Anzeichen einer bereits deutlich erhöhten Flexibilität der NH-Vektoren; Aufnahmeparameter für ^{15}N -GPdom15kurz und ^{15}N -GPdom15 (Proben G und D, Tab. 3.5, Kap. 3.15.3) wie in Tab. 3.4 (Kap. 3.15.3) aufgeführt.

Der durchschnittliche $\{^1\text{H}\}^{15}\text{N}$ NOE ist für GPdom15 und GPdom15kurz nahezu identisch und beträgt hier $0,74 (\pm 0,03)$ bzw. $0,76 (\pm 0,04)$, während die übrigen 24 aminoterminalen Aminosäuren eine insgesamt etwas weniger rigide Rückgratkonformation aufweisen. Die Beweglichkeit des Proteinrückgrates der ersten 5 Aminosäuren nimmt dabei in Richtung NH_2 -Terminus deutlich zu und auch Arg13 und Ile14 sowie die Reste Asp21 und Leu22 in P1'- und P2'-Position der inhibitorischen Schleife (Nomenklatur nach Schechter & Berger, 1967) sind klar als flexibel (ps-ns-Zeitskala) einzustufen. Der heteronukleare NOE für den COOH-Terminus wird über Ser60 und Ser61 rasch kleiner und liegt für die übrigen COOH-terminalen Aminosäuren im negativen Bereich, weshalb der COOH-terminale Sequenzabschnitt als hochflexibel (ps-ns-Zeitskala) zu werten ist und dies auch die sehr geringe Anzahl an beobachteten NOE-Kreuzresonanzen für diese Reste erklärt (vgl. Abb. 4.31, Kap. 4.6.7).

4.6.7 Strukturberechnung auf Basis der NMR-Daten

Mit Hilfe des iterativen Zuordnungsverfahrens der NOE-Kreuzresonanzen (Kap. 3.16.2.1) konnten aus den ^{15}N -editierten NOESY-Spektren für GPdom15 kurz 504, bzw. für GPdom15 525 Distanzbeschränkungen und aus den homonuklearen Aufnahmen 326 weitere Abstands-

intervalle bestimmt werden. Zusammen mit 29 aus den $^3\text{J}(\text{HN}, \text{H}\alpha)$ -Kopplungskonstanten abgeleiteten Diederwinkel-Einschränkungen (Kap. 3.16.2.2) und 14 identifizierten Wasserstoffbrücken (je 2 Distanzvorgaben; Kap. 3.16.2.3) wurden 887, bzw. 908 experimentelle Randbedingungen für die abschließenden Strukturberechnungen verwendet (Tab. 4.5).

Als weitere Vorgabe sollte auch das Muster der Disulfidverbrückung berücksichtigt werden, was als feste Distanzbeschränkung der entsprechenden Schwefelatome von $2,02 \pm 0,1 \text{ \AA}$ erfolgte (Kap. 3.16.3.2). Das Vorliegen der Kazal-typischen 1-5/2-4/3-6-Konnektivität konnte aufgrund des Auftretens von charakteristischen NOEs als gesichert angenommen werden (Kap. 4.6.5). Zudem ergaben Testrechnungen mit identischen experimentellen Randbedingungen und ansonsten gleichen *simulated annealing* Protokollen (Anhang, Kap. 10.4.3) aber ohne vorgegebenen Abstand der Schwefelatome (Kap. 3.16.3.2) für beide dom15-Varianten keine Veränderungen hinsichtlich Struktur oder Verbrückungsmuster. Da für die Thiolgruppen bei nicht vorgegebener Disulfidverbrückung eine energetisch günstige Anordnung berechnet wird, bei der diese nicht direkt aufeinander zu orientiert sind, waren die Abstände der Schwefelatome hier erwartungsgemäß etwas größer, während auch für Rechnungen, die überdies ohne Datenbank-Potential durchgeführt wurden, Entfernungen zwischen den $\text{C}\alpha$ -Atomen der normalerweise disulfidverbrückten Cysteine resultierten (Bsp. $d(\text{C}\alpha_{\text{Cys18}} \text{C}\alpha_{\text{Cys37}}) = 4,9 - 5,1 \text{ \AA}$), wie sie bei Strukturrechnungen mit Distanzvorgabe der Schwefelatome zu beobachten waren ($d(\text{C}\alpha_{\text{Cys18}} \text{C}\alpha_{\text{Cys37}}) = 5,0 - 5,1 \text{ \AA}$).

Mit Hilfe der beschriebenen *simulated annealing*-Strategie (Kap. 3.16.3.2) wurden zuletzt 200 Strukturen berechnet, von denen nur jeweils 15 Strukturen einen deutlich höheren Anstieg der Gesamtenergie zeigten. Bei den übrigen war nur eine allmähliche Zunahme der Energiewerte zu verzeichnen und die akzeptierten 31 energieärmsten Strukturen konvergierten sehr gut. Neben einer nur geringen Streuung der Gesamtenergie und nur geringen Abweichungen der Bindungslängen und -winkel von der idealen Geometrie (Tab. 4.5) lagen bei diesen Strukturen die wenigen Verletzungen der Distanzvorgaben stets unter $0,12 \text{ \AA}$ (GPdom15), bzw. $0,122 \text{ \AA}$ (GPdom15kurz) und systematische Verletzungen unter der vorgegebenen Erfassungsgrenze von $0,10 \text{ \AA}$.

Nachdem die Torsionswinkel Φ und Ψ des Proteinrückgrates aus sterischen Gründen nur bestimmte Wertebereiche annehmen können (Ramachandran *et al.*, 1963), diente als weiteres Gütekriterium der berechneten Strukturen die Analyse dieser Winkelkombinationen mit dem Programmpaket PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993, 1996; Kap. 3.16.3.3). Diese ergab für

Tab. 4.5: Zusammenstellung der wichtigsten Parameter der abschließenden Strukturberechnungen von GPdom15kurz und GPdom15

Experimentelle Randbedingungen der abschließenden Strukturberechnungen				
Abstandsbeschränkungen durch:	GPdom15kurz	GPdom15		
- Interresiduale NOEs	830	851		
sequentiell	360	375		
mittelweitreichend	176	182		
weitreichend	294	294		
- Wasserstoffbrückenbindungen (je 2 Distanzvorgaben)	14	14		
Einschränkung der Diederwinkel Φ durch $^3J(\text{HN}, \text{H}\alpha)$	29	29		
Statistik zu den jeweils 31 akzeptierten der 200 abschließend berechneten Strukturen				
Durchschnittliche Energiewerte [kcal/mol]	GPdom15kurz	GPdom15		
E_{total}	$18,83 \pm 1,37$	$21,93 \pm 0,99$		
E_{bonds}	$1,11 \pm 0,11$	$1,27 \pm 0,092$		
E_{angles}	$9,17 \pm 0,64$	$10,35 \pm 0,42$		
E_{improper}	$2,83 \pm 0,19$	$3,78 \pm 0,27$		
E_{repel}	$1,88 \pm 0,73$	$2,36 \pm 0,88$		
E_{NOE}	$3,83 \pm 0,56$	$4,16 \pm 0,73$		
E_{cdih}	$0,0097 \pm 0,021$	$0,0042 \pm 0,0084$		
Durchschnittliche Abweichungen von der idealen Geometrie				
Bindungslängen [Å]	$0,0011 \pm 0,000056$	$0,0011 \pm 0,000039$		
Abstandsbeschränkungen [Å]	$0,0094 \pm 0,00068$	$0,0097 \pm 0,00085$		
Bindungswinkel [°]	$0,19 \pm 0,0067$	$0,18 \pm 0,0037$		
Improperwinkel [°]	$0,35 \pm 0,0040$	$0,41 \pm 0,0041$		
Diederwinkelbeschränkungen [°]	$0,048 \pm 0,058$	$0,026 \pm 0,042$		
Durchschnittliche Abweichungen (RMSD) von der mittleren Struktur [Å]				
	backbone	heavy	backbone	heavy
gesamte Struktur	0,60	1,14	3,90	4,12
Sequenzbereich Ser2-Cys58	0,57	1,07	0,54	1,05
Sequenzbereich Ser2-Cys5 und Leu15-Cys58	0,38	0,80	0,37	0,81
Sequenzbereich mit regulärer Sekundärstruktur	0,49	0,93	0,66	1,14
gemeinsamer Sequenzbereich mit reg. Sekundärstruktur	0,49	0,93	0,46	0,91
gemeins. Sequenzb. mit reg Sek.struktur ohne Lys6-Asp7	0,37	0,82	0,35	0,81

Angabe der Gesamtenergie (E_{total}) bzw. Energiebeiträge der kovalenten Bindungen (E_{bonds}), der Bindungs- (E_{angles}) und Improperwinkel (E_{improper}), der Abstoßungsenergie (E_{repel}), der Abstandsbeschränkungen (E_{NOE}) und Diederwinkel-Vorgaben (E_{cdih}) sowie der Abweichungen von der idealen Geometrie als Mittelwert (\pm Standardabweichung) über die 31 akzeptierten Strukturen; Bereiche regulärer Sekundärstrukturelemente: Ser2-Cys7, Val25-Gly27, Thr31-Tyr33, Cys37-Arg46, Ile52-Thr55, für GPdom15 zusätzlich: Cys58-Ser61; *backbone*: schwere Atome des Proteinrückgrates (C α , CO, N); *heavy*: alle schweren Atome.

GPdom15kurz, dass 90,3 % der Reste – Glycine und Proline werden nicht berücksichtigt – in besonders bevorzugten und die übrigen in sterisch günstigen Konformationen vorliegen. Für GPdom15 wurden für 90,7 % der Aminosäuren besonders bevorzugte und für insgesamt 99,9 % sterisch günstige Kombinationen festgestellt. Aus sterischen Gründen verbotene Konformationen wurden nicht beobachtet. Abb. 4.29 gibt eine Überlagerung des entsprechenden Ramachandran-Diagrammes der Übersichtlichkeit wegen nur der jeweils energieärmsten der akzeptierten Strukturen von GPdom15 und GPdom15kurz wieder.

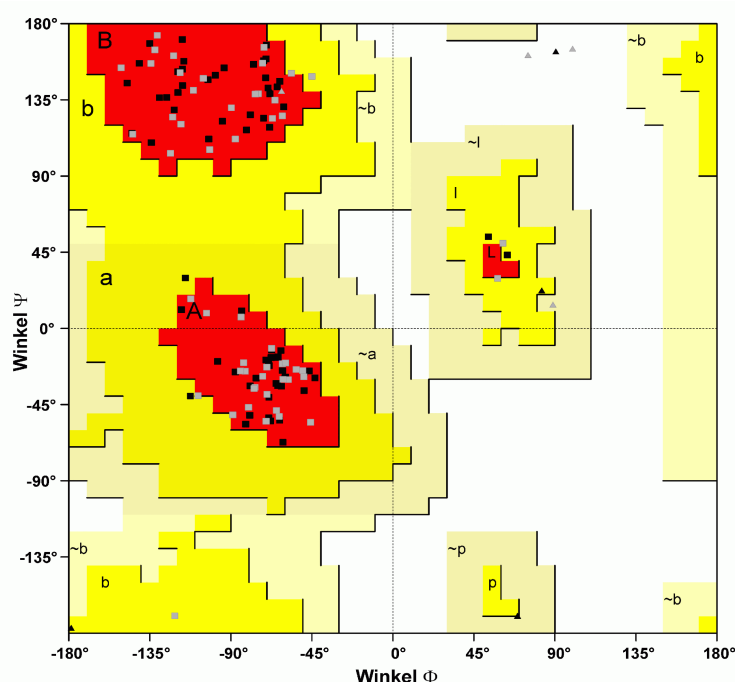


Abb. 4.29: Ramachandran-Diagramm der jeweils energieärmsten der akzeptierten Strukturen von GPdom15 (■) und GPdom15kurz (▴)

Glycine sind durch Dreiecke symbolisiert, die übrigen Reste durch Quadrate; die in den Strukturdatenbanken besonders häufig anzutreffenden Proteinerückgrat-Konformationen A (typisch für α -Helices), B (typisch für β -Faltblätter) und L sind rot, seltenere Konformationen gelb und sehr seltene blassgelb eingefärbt; die übrigen Winkelkombinationen sind sterisch extrem ungünstig und werden daher fast nie beobachtet.

Während die Überlagerung der 31 akzeptierten Strukturen für GPdom15kurz (Abb. 4.30) eine durchschnittliche Abweichung (RMSD) der Positionen der schweren Atome des Proteinerückgrates (C α , CO, N) von 0,60 Å und die aller schweren Atome von 1,14 Å bezüglich der mittleren Struktur ergibt (Tab. 4.5), liegen die entsprechenden Werte für die nicht verkürzte Domäne 15-Variante aufgrund des unstrukturierten COOH-terminalen Bereiches bei 3,90 Å bzw. 4,12 Å (Tab. 4.5). Nahezu identische RMSD-Werte für GPdom15kurz und GPdom15 erhält man dagegen bei Betrachtung des gemeinsamen Sequenzbereiches Ser2 bis Cys58 mit rund 0,55 Å für das Proteinerückgrat bzw. 1,06 Å für alle schweren Atome. Ohne Berücksichtigung der beiden Reste Lys6 und Asp7 verringert sich die Abweichung der Atomkoordinaten von der über die gemeinsamen Abschnitte mit regulärer Sekundärstruktur gemittelten Struktur von 0,49 Å (Proteinerückgrat) bzw. 0,93 Å (alle schweren Atome) auf 0,37 Å bzw. 0,82 Å und entspricht damit den Werten, wie sie für den Sequenzbereich Ser2 bis Cys5 und Leu15 bis Cys58 festgestellt werden.

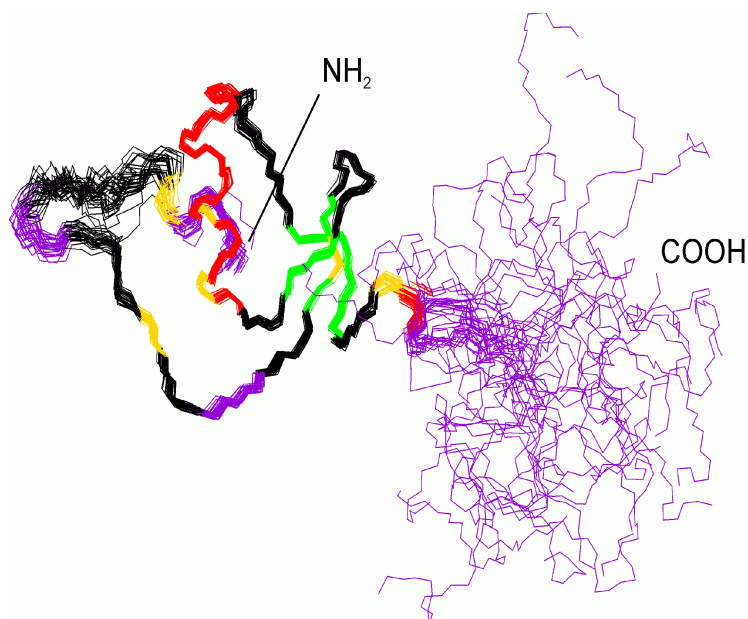


Abb. 4.30: Überlagerung der 31 akzeptierten Strukturen von GPdom15

Verlauf des Proteinrückgrates jeder Struktur ist ohne aminoterminaler Gly-Pro-Sequenz nach Mittelung auf die mit GPdom15kurz gemeinsamen Abschnitte mit regulärer Sekundärstruktur schematisch dargestellt; helikale Bereiche sind rot, Faltblattstränge grün, Cysteine gelb und Bereiche mit einem heteronuklearen $\{^1\text{H}\}^{15}\text{N}$ NOE kleiner 0,6 violett eingefärbt; Termini sind mit NH_2 und COOH bezeichnet.

Die Aufschlüsselung der RMSD-Werte nach der Position in der Aminosäuresequenz zeigt für die COOH -terminalen Reste ab Glu59 eine stetig zunehmende Abweichung von der mittleren Struktur. Diese kann mit der geringen Anzahl der aus den NOESY-Spektren gewonnenen experimentellen Abstandsbeschränkungen (Abb. 4.31 a) sowie der größer werdenden Beweglichkeit der NH -Vektoren korreliert werden (Abb. 4.28) und ist auf eine zufällige, sterisch günstige und damit energiearme Orientierung dieser Aminosäuren in den Strukturrechnungen zurückzuführen. Für den gemeinsamen Sequenzbereich von GPdom15kurz und GPdom15 ergeben sich nahezu identische Abweichungen von der mittleren Struktur, darunter zwei Abschnitte mit leicht erhöhten RMSD-Werten. Die für die Linker-Region zwischen zentraler Helix und dem dritten Faltblatt-Strang (Gln47-Asn49) sowie für die P1-P1'-Region (Lys20-Asp21) beobachtete, im Vergleich zu ihren Sequenznachbarn etwas größere Streuung der Atomkoordinaten um ihren Mittelwert, lässt sich ebenfalls auf eine jeweils geringere Anzahl insbesondere von weitreichenden NOEs dieser Reste zurückführen (Abb. 4.31 a). Für Asp21 wurde zudem eine deutlich erhöhte Beweglichkeit (ps-ns-Zeitskala) festgestellt (Abb. 4.28, Kap. 4.6.6).

Eine etwas deutlichere Abweichung von der Proteinkonformation, die über die gemeinsamen Sequenzbereiche mit regulärer Sekundärstruktur jedoch ohne die Reste Lys6 und Asp7 gemittelt wurde, zeigt die NH_2 -terminale Region Lys6 bis Ile14. Dem heteronuklearen $\{^1\text{H}\}^{15}\text{N}$ NOE zufolge sind nur Arg13 und Ile14 in diesem Bereich als flexibel (ps-ns-Zeitskala) einzustufen (Kap. 4.6.6), so dass Flexibilität (ps-ns-Zeitskala) als Ursache für die hohen RMSD-Werte gerade für die Reste Cys5 bis Leu11 ausgeschlossen werden kann.

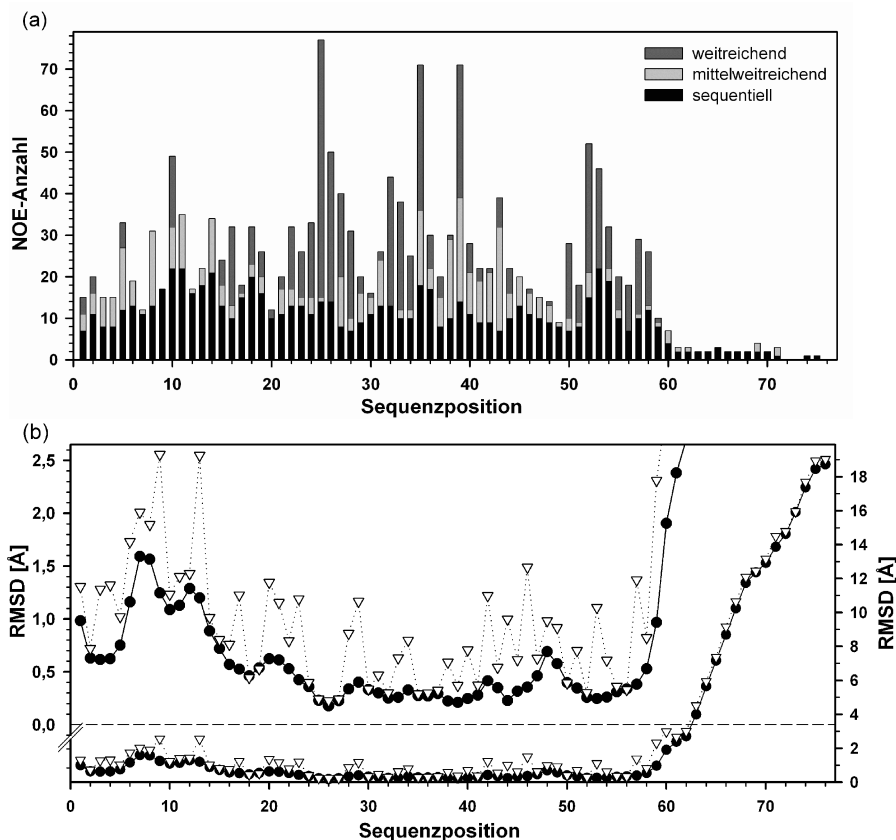


Abb. 4.31: Aufschlüsselung der aus den NOE-Kreuzresonanzen abgeleiteten Abstandsbeschränkungen (a) und der atomaren Abweichungen von der mittleren Struktur (b) nach Sequenzposition für GPdom15

Pro Aminosäure (a) Anzahl der weitreichenden, mittelweitreichenden und sequentiellen NOEs und (b) durchschnittliche Abweichung (RMSD) der Position der Atome C α , CO und N des Proteinrückgrates (schwarze Kreise) bzw. aller schweren Atome (Dreiecke) der 31 akzeptierten Strukturen von GPdom15 bezüglich der über den Sequenzbereich von Ser2-Cys5, Val25-Gly27, Thr31-Tyr33, Cys37-Arg46 und Ile52-Thr55 berechneten Durchschnittsstruktur.

Aufgrund der geringen Anzahl an NOEs für Asp7 (Abb. 4. 31 a) nimmt dieses bei 8 von 31 akzeptierten Strukturen von GPdom15 bzw. 9 im Fall von GPdom15kurz eine gestreckte sonst aber eine helikale Konformation ein. Diese lokale Unterbestimmung wirkt sich auch auf die RMSD-Werte der nachfolgenden Aminosäuren aus, die als Folge der unterschiedlichen Helixlänge und der damit verbundenen entsprechend anders arrangierten Konformation bzw. Position im Koordinatenraum entsprechend höher ausfallen. Ohne fixierende Kontakte zu den anderen Aminosäuren des Proteins und mit nur wenigen sekundärstrukturspezifischen NOEs innerhalb des Sequenzbereiches zwischen den ersten beiden Cysteinen ergeben sich offensichtlich energetisch nahezu gleichwertige Konformationen für diesen Abschnitt, ohne dass eine Tendenz oder Bevorzugung bezüglich einer bestimmten Anordnung erkennbar oder ableitbar wäre. Bei gegenüber dem übrigen Protein bereits höheren RMSD-Werten für Ser2 bis Cys5 hebt sich die in Richtung NH₂-Terminus zunehmende Beweglichkeit der NH-Vektoren

nur für Asp1 durch eine nochmal deutlich größere Abweichung der Atomkoordinaten von der gemittelten Struktur ab.

Wie bereits erwähnt (Kap. 4.6.1.5), fanden sich in den NMR-Spektren keinerlei Hinweise auf Wechselwirkung der zusätzlichen aminoterminalen Gly-Pro-Sequenz mit dem übrigen Protein. Um einen möglichen sterischen Einfluss dieser beiden Aminosäuren auf die Struktur von GPdom15kurz bzw. GPdom15 ausschließen zu können, wurden während des iterativen Zuordnungsprozesses immer wieder Testrechnungen für die entsprechend um zwei Reste längeren Sequenzen durchgeführt. Auch für die finalen Strukturen, die mit Hilfe des Programmes SYBYL (Tripos Inc.) um die Gly-Pro-Sequenz am NH₂-Terminus verlängert und anschließend energieminiert wurden, war beim Vergleich der Strukturen mit und ohne Gly-Pro-Sequenz keine Veränderung der Strukturen festzustellen (Abb. 4.32).

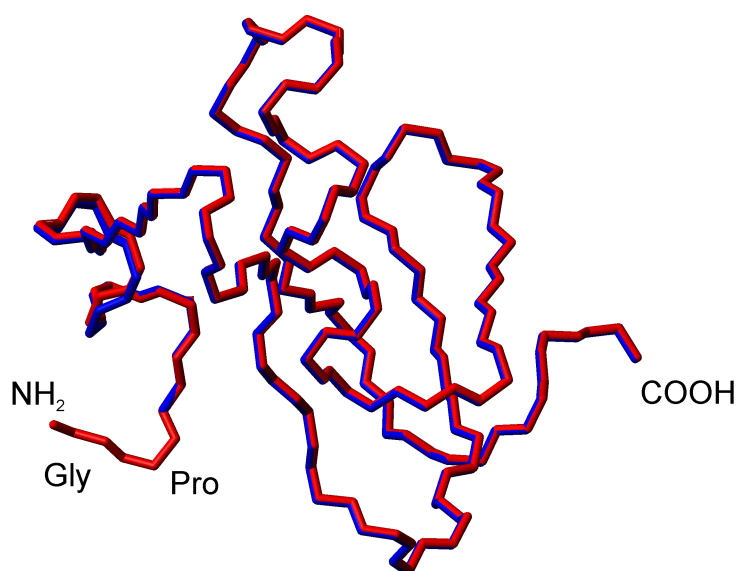


Abb. 4.32: Überlagerung einer akzeptierten finalen Struktur von GPdom15 vor (blau) und nach (rot) NH₂-terminaler Addition der Gly-Pro-Sequenz und Energieminimierung

Schematische Darstellung des Proteinrückgrat-Verlaufes; Termini sind mit NH₂ und COOH bezeichnet.

Zur Überprüfung des Einflusses des Datenbank-Potentials auf die berechneten Strukturen wurden unter Verwendung des ansonsten gleichen *simulated annealing* Protokolls (Anhang, Kap. 10.4.3) und der identischen experimentellen Randbedingungen (vgl. Anhang, Kap. 10.3) weitere 100 (GPdom15kurz), bzw. 110 (GPdom15) Strukturen berechnet, jedoch ohne dabei auf den Datenbank-Term zurückzugreifen. Die Strukturen konvergierten ebenfalls sehr gut und die jeweils energieärmsten 15 % (entsprechend den 31 akzeptierten von 200 mit Datenbank-Potential berechneten Strukturen) zeigten weder für GPdom15 noch für die verkürzte Variante Verletzungen der Abstandsbeschränkungen über der vorgegebenen Erfassungsgrenze von 0,10 Å. Da im Vergleich zu den mit Datenbank-Potential errechneten Strukturen hier eine Zielfunktion der Moleküldynamik-Simulation zu minimieren war, die einen Term weniger

aufwies, wurden auch erwartungsgemäß geringere Gesamtenergien erhalten. Die einzelnen Energieterme hatten daran einen jeweils annähernd gleichen prozentualen Anteil und die durchschnittlichen Abweichungen von der idealen Geometrie lagen in der gleichen Größenordnung wie bei den Strukturen, die mit Datenbank-Term berechnet wurden. Auch die RMSD-Werte der mit und ohne Datenbank-Potential berechneten Strukturen unterscheiden sich nur wenig. So beträgt die Abweichung für den Sequenzbereich Ser2 bis Cys58 0,53 Å, bzw. für GPdom15 0,51 Å für das Proteinrückgrat und für beide Varianten 1,06 Å für alle schweren Atome. Erwartungsgemäß ergeben sich auch für die mit und ohne Datenbank-Potential berechneten Strukturen untereinander keine größeren Abweichungen als für die jeweilige Schar für sich betrachtet (Abb. 4.33).

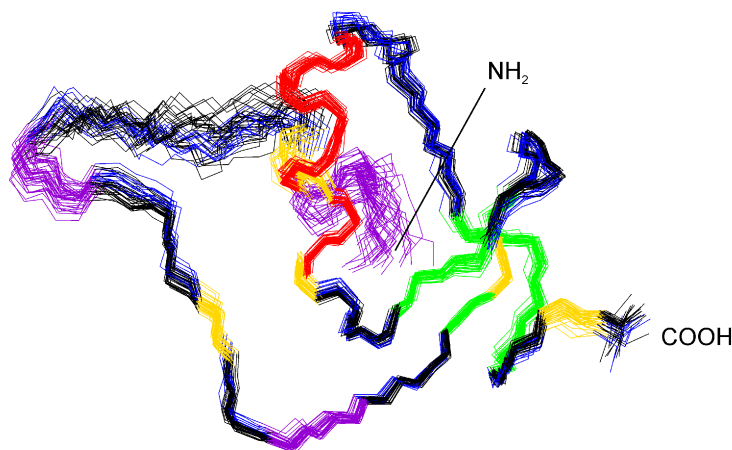


Abb. 4.33: Überlagerung der mit (schwarz) und ohne Datenbank-Potential (blau) berechneten Strukturen von GPdom15

Der Verlauf des Proteinrückgrates jeder Struktur ist ohne aminoterminaler Gly-Pro-Sequenz nach Mittelung auf Sequenzbereiche mit regulärer Sekundärstruktur schematisch dargestellt; helikale Bereiche rot, Faltblattsprünge grün, Cysteine gelb und Bereiche mit einem heteronuklearem $\{^1\text{H}\} \ ^{15}\text{N}$ NOE kleiner 0,6 violett eingefärbt; Termini sind mit NH_2 und COOH bezeichnet.

Der Anteil an sterisch besonders bevorzugten Konformationen liegt bei diesen Strukturen im Vergleich zu den mit Datenbank-Term berechneten mit 76,2 % (GPdom15kurz), bzw. 68,4 % (GPdom15) erwartungsgemäß niedriger. Den größten Beitrag zu diesem Unterschied liefern vor allem die Reste, für die nur wenige NOEs beobachtet wurden (z.B. Asp7, Asn49, COOH-terminaler Bereich) und nun eine sterisch nurmehr günstige Winkelkombination einnehmen. Insgesamt ergeben sich für 99,5 % (GPdom15kurz), bzw. 96,8 % (GPdom15) der berücksichtigten Aminosäuren (kein Glycine oder Proline) eine sterisch günstige Konformation. Ser2 sowie einige Reste des COOH-terminalen Abschnittes (Ser61; Ser62; Thr63; Thr66; Ser74) nehmen vereinzelt (insgesamt 1 %) sterisch ungünstige Winkel ein.

4.6.8 Die Struktur von GPdom15kurz bzw. GPdom15 in Lösung

Die Analyse der akzeptierten Strukturen von GPdom15 bzw. GPdom15kurz auf reguläre Sekundärstrukturelemente mit den Programmen PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993, 1996), WHAT IF (Vriend, 1990) und PROMOTIF (Hutchinson & Thornton, 1996) bestätigte in Übereinstimmung mit dem Ergebnis der Überprüfung der Strukturen, die ohne Datenbank-Potential berechnet wurden, im Wesentlichen die bereits aus den sekundärstrukturtypischen experimentellen Daten abgeleiteten Erkenntnisse (Kap. 4.6.3.3, 4.6.3.4). Neben einer zentralen α -Helix, die von Cys37 bis Arg46 reicht, weist GPdom15 bzw. GPdom15kurz in Lösung einen weiteren α -helikal strukturierten Bereich auf (Abb. 4.34), der die Reste Ser2 bis meist Asp7 umfasst. Unter schwachem Kontakt zwischen Asp1 bzw. Ser2 und His51 bzw. Ile52 bildet dieser helikale Abschnitt mit der zentralen Helix einen Winkel von etwa 60° . In einigen Fällen wird für Asp7 auch eine gestreckte Konformation errechnet, wodurch die Anordnung auch der nachfolgenden Reste entsprechend beeinflusst wird (Kap. 4.6.7). Dies ist auf die geringe Anzahl an Randbedingungen für Asp7 zurückzuführen, da die Analyse der sekundärstrukturtypischen experimentellen Daten klar für die Beteiligung von Asp7 an der kurzen NH_2 -terminalen Helix spricht (Kap. 4.6.3.3). Für die zentrale Helix, für die mehrere Wasserstoffbrücken-Bindungen identifiziert wurden (M38.HN-N35.OD1; L39.HN-P36.O; N43.HN-L39.O; L44.HN-C40.O; L44.HN-H41.O; R46.HN-E42.O), wird aufgrund einiger charakteristischer NOE-Kreuzresonanzen des Typs $\text{H}\alpha_{(i)}\text{HN}_{(i+4)}$ das Vorliegen einer α -Helix klar bestätigt, während solche eindeutig α -helikalen NOEs für die kurze NH_2 -terminale Helix nicht beobachtet wurden.

Ein *turn* vom Typ I (Venkatachalam, 1968), gebildet von Pro12 bis Ile14, bringt die übrigen Reste zwischen den ersten beiden Cysteinen, die ebenfalls eine überwiegend gestreckte Rückgrat-Konformation zeigen, in eine V-förmige Anordnung (Abb. 4.34). Die beiden aromatischen Seitenketten von Tyr8 und Tyr16 sind dabei jeweils in die Mitte ragend aufeinander zu orientiert und packen meist parallel bzw. vereinzelt senkrecht aufeinander. Ihre Nähe zu den Seitenkettenprotonen von Val10 und der damit mögliche Einfluss des Ringstromeffektes erklärt die deutliche Hochfeldverschiebung der γ -Methylprotonen von Val10 ($\delta(^1\text{H})\text{H}\gamma 1^* = 0,551$ ppm; $\delta(^1\text{H})\text{H}\gamma 2^* = 0,182$ ppm; Abb. 4.15; Kap. 4.6.1.1): Durch Wechselwirkung des Elektronensystems von Aromaten mit dem äußeren Feld wird ein lokales Magnetfeld induziert (Ringstromeffekt), das sich bis in etwa $4,5 \text{ \AA}$ Entfernung bemerkbar macht und die Protonen ober- oder unterhalb der Ringebene abschirmt, während die Resonanzen der in der Ringebene liegenden Protonen zu tieferem Feld verschoben werden (Wüthrich, 1986).

Die bezüglich den entsprechenden, in der BMRB-Datenbank aufgeführten mittleren Verschiebungen ($\delta(^1\text{H})\text{H}\alpha = 4,72 \text{ ppm}$; $\delta(^1\text{H})\text{H}\beta2 = 2,95 \text{ ppm}$) stark hochfeldverschobenen Werte des α - und $\beta2$ -Protons von Cys37 ($\delta(^1\text{H})\text{H}\alpha = 3,19 \text{ ppm}$; $\delta(^1\text{H})\text{H}\beta2 = 0,87 \text{ ppm}$) sind hingegen wohl keine Folge eines Ringstromeffektes (vgl. Diskussion, Kap. 5.4). Starke Hochfeldshifts von Protonen des gerade am Helixanfang lokalisierten Cysteins wurden auch bei anderen Kazalinhitoren beobachtet (Hemmi *et al.*, 2002; Schlott *et al.*, 2002; Williamson *et al.*, 1985).

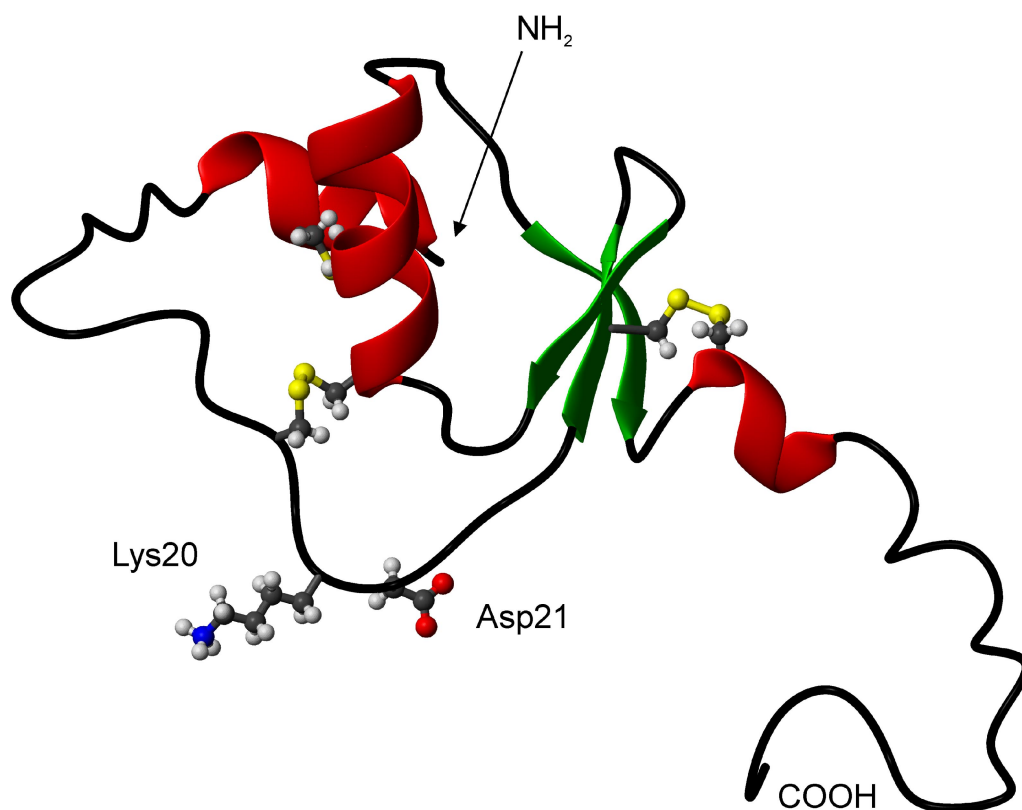


Abb. 4.34: Schematische Darstellung der Struktur von GPdom15

Verlauf des Proteinrückgrates und Abschnitte mit regulären Sekundärstrukturelementen am Beispiel einer der akzeptierten Strukturen ohne aminoterminalen Gly-Pro-Sequenz schematisch dargestellt; helikale Bereiche sind rot, Faltblattstränge grün eingefärbt; Seitenketten der Cysteine (5-40; 18-37; 26-58) sowie der Reste in P1- (Lys20) und P1'-Position (Asp21) sind als Kugel-Stabmodell wiedergegeben; Termini sind mit NH_2 und COOH bezeichnet.

Das Proteinrückgrat der inhibitorischen Schleife (P3-P3'-Region) wird u.a. durch etliche Kontakte zu Asn34 sowie zu der über eine Wasserstoffbrücke fixierten (M38.HN-N35.OD1) Seitenketten von Asn35 stabilisiert. Dabei sind die Seitenketten von Lys20 (P1) und Asp21 (P1') in den Raum vom eigentlichen Protein weg orientiert und weisen aufgrund der nur wenigen experimentell gefundenen Einschränkungen erwartungsgemäß eine deutliche Variabilität der Seitenkettenwinkel χ auf. Die P1- und P1'-Position für Lys20 bzw. Asp21 wurde mittels Tryp-

sinspaltung und aminoterminaler Sequenzierung der RP-HPLC-gereinigten Spaltprodukte von GPdom15 nachgewiesen (Kap. 3.9; persönliche Mitteilung, Dr. Peter Kreutzmann, IPF Pharmaceuticals, Hannover).

Über etliche Wasserstoffbrücken-Bindungen stabilisiert (V25.HN-T33.O; C26.HN-S54.O; G27.HN-Q31.O; D28.HN-H51.O; G30.HN-G27.O; T33.HN-V25.O; R53.HN-C26.O) bilden die folgenden Abschnitte Val25-Gly27 und Gln31-Tyr33 sowie der Bereich Ile52-Thr55 ein kurzes dreisträngiges antiparalleles β -Faltblatt, wobei der erste Faltblatt-Strang in der Mitte angeordnet ist und mit dem zweiten Strang haarnadelförmig verbunden ein sogenanntes β -hairpin 3:5 Motiv (Sibanda *et al.*, 1989) ausbildet. Der verlangsamte Austausch der Amidprotonen von Asp29 und Gln31 (Kap. 4.6.3.2), für die unter den vorgegebenen Kriterien kein Akzeptor identifiziert werden konnte, erklärt sich durch die sterische Abschirmung gegenüber dem umgebenden Lösungsmittel der nach innen zum Protein hin orientierten Amidprotonen. Im Anschluss an den dritten Faltblattstrang ergibt sich bei GPdom15, getrennt durch Gly56 und Lys57, ein weiterer kurzer (3_{10} -) helikal strukturierter Bereich, der die Reste Cys58 bis Ser61 umfasst. Gly56 nimmt dabei auch bei GPdom15kurz eine stets *turn*-artige Konformation ein.

Den eigentlichen hydrophoben Kern, der vor allem für die Orientierung der zentralen α -Helix und des β -Faltblattes zueinander verantwortlich ist, bilden die Seitenketten der Reste Val25, Tyr33, Leu39 und Ile52. Dementsprechend werden mit jeweils über 50 beobachteten NOEs alleine der Seitenkettenprotonen für Val25 und Leu39 die meisten Kontakte überhaupt festgestellt (Abb. 4.31). Direkt zentral unterhalb der Ringebene der Seitenketten von Tyr33 befindet sich dabei eine der beiden δ -Methylgruppen von Leu39, wodurch, wie schon bei Val10, eine starke Hochfeldverschiebung dieser Protonen resultiert ($\delta(^1\text{H})\text{H}\delta 1^* = 0,45 \text{ ppm}$; $\delta(^1\text{H})\text{H}\delta 2^* = -0,03 \text{ ppm}$; Abb. 4.15).

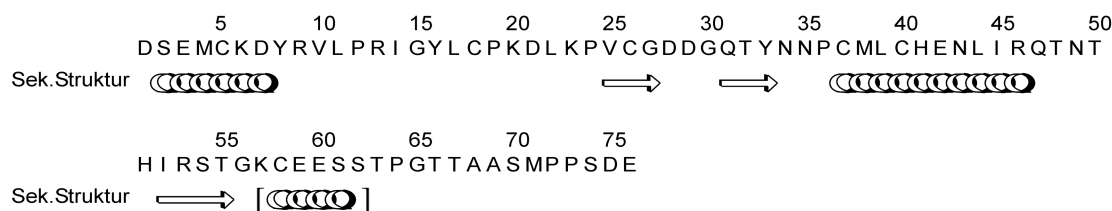


Abb. 4.35: Schematische Darstellung der regulären Sekundärstrukturelemente von GPdom15 bzw. GPdom15kurz

Position und Länge der regulären Sekundärstrukturelemente (Sek. Struktur), wie sie aus der Strukturberechnung von GPdom15 und GPdom15kurz erhalten wurden, stimmen bis auf den helikalen Abschnitt (Cys58-Ser61) überein, der bei GPdom15kurz fehlt und daher mit [] markiert ist; der NH_2 -terminale GP-Überhang ist nicht dargestellt.

Bei GPdom15kurz sind damit 23,7 % der Aminosäuren α -helikal strukturiert und 15,3 % sind an der Ausbildung des β -Faltblattes beteiligt. Für GPdom15 liegt der Anteil für eine β -Faltblattstruktur bei 13,2 %, bei 18,4 % für eine α -Helix- und bei 5,3 % für eine 3_{10} -Helix-Struktur (Abb. 4.35).

Die berechneten Strukturen von GPdom15 und GPdom15kurz sind unter der Kennung 1uvg bzw. 1uvf in der Proteindatenbank (<http://www.rcsb.org/pdb>; Berman *et al.*, 2000) hinterlegt.

4.7 Die LDTI-Variante GPdom15ldti

Wie bereits erwähnt (Kap. 4.5.3; Abb. 4.13), zeigt die LEKTI-Domäne 15 vor allem im Bereich der inhibitorischen Schleife (P3-P3'-Region) eine starke Sequenzhomologie zu dem Tryptase-Inhibitor LDTI. Nachdem der Abschnitt zwischen den ersten beiden Cysteinen bei LDTI lediglich einen Rest, ein Alanin, umfasst, sollte im Sinne eines strukturbasierten Wirkstoffdesigns eine entsprechende Deletionsmutante der LEKTI-Domäne 15 hergestellt, deren inhibitorische Eigenschaften untersucht und ihre Struktur aufgeklärt werden. Ein Vergleich der entsprechenden Sequenzen zeigt (Abb. 4.36), dass fast die Hälfte der Reste von GPdom15ldti und LDTI identisch sind und daher eine ähnlich stark ausgeprägte Tertiärstruktur zu erwarten war (PDB: 1an1, Di Marco & Priestle, 1997; 1ldt, Stubbs *et al.*, 1997). Auch nach einer komparativen Molekülmodellierung mit Hilfe des Programmes SYBYL (Tripos Inc.; Kap. 3.17) auf die für GPdom15kurz energieärmste berechnete Struktur waren durch die Substitution der entsprechenden Reste keine Auswirkungen auf die übrigen Regionen des Proteins und daher eine GPdom15kurz-ähnliche Strukturierung zu erwarten (vgl. Abb. 4.40, Kap. 4.7.2).

```

LDTI          ---KKVCACPKILKPVCSDGRTYANSCIARCNGVSIK-----SEGSCPTGILN
               .:***** *****.:**:* * * * * * * * *
GPdom15ldti   GPDSEMCACPKDLKPVCDDGQTYNNPCML-CHENLIRQTNTHIRSTGKCE-----

```

Abb. 4.36: Vergleich der Aminosäuresequenz des Tryptase-Inhibitors LDTI mit der der LEKTI-Domäne 15 LDTI-Variante GPdom15ldti

Identische (*) und ähnliche Reste (:) bzw. (.) sind markiert; basierend auf einem mit T-COFFEE (<http://www.ch.embnet.org/software/TCoffee.html>; Notredame *et al.*, 2000) erstellten Vergleich.

Die CD-spektroskopische Analyse von GPdom15ldti, das auf analoge Weise wie GPdom15kurz gewonnen wurde (Kap. 4.3), ließ jedoch auf einen nur sehr geringen Anteil mit regulärer Sekundärstruktur schließen (Kap. 4.4.2), und auch bei der weiteren strukturellen Charakterisierung mittels ein- und zweidimensionaler NMR-Spektroskopie wurden nur Spek-

tren mit sehr geringer Dispersion erhalten, was als ein deutliches Anzeichen für eine wenig ausgeprägte Tertiärstruktur zu werten ist (Wüthrich, 1986).

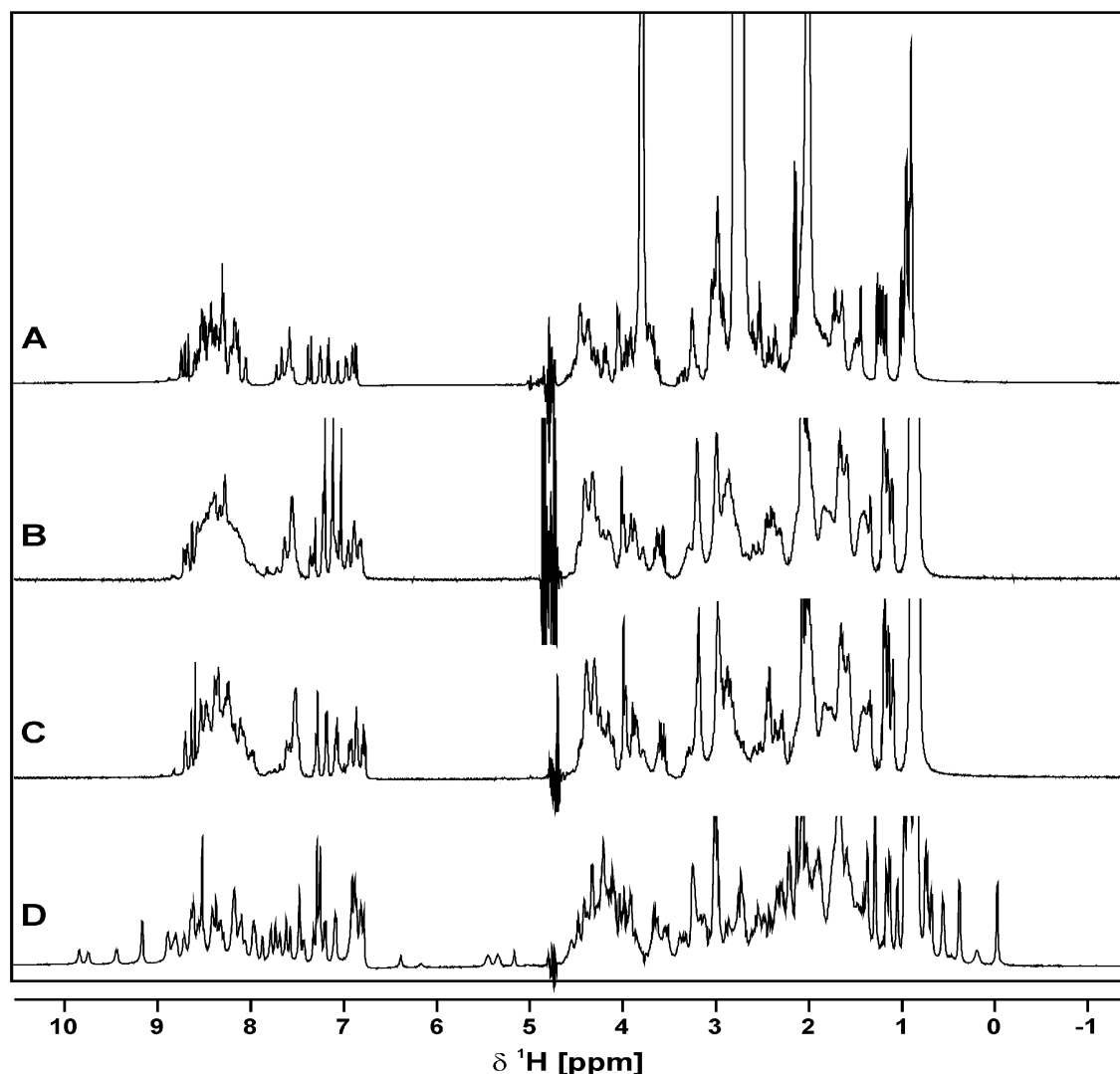


Abb. 4.37: Vergleich der 1D- ^1H -Spektren von GPdom15ldti nach Erhitzen unter reduzierenden Bedingungen (A), nach Reoxidation (B), vor Reduktion (C) und von GPdom15kurz (D)

A: GPdom15ldti (ca. 400 μM) in *aqua bidest.* mit DTT nach Erhitzen auf 60° C für 24 h in gesättigter DTT-Lösung; B: GPdom15ldti (ca. 300 μM) RP-HPLC gereinigt in *aqua bidest.* nach Reoxidation; C: GPdom15ldti (ca. 800 μM) RP-HPLC gereinigt in *aqua bidest.* vor Reduktion; D: GPdom15kurz (1,6 mM) in 20 mM Kalium-Phosphat-Puffer (pH 6,4); jeweils 10 % (v/v) D_2O ; T = 298 K; TD = 16 k (A), 32 k (B, C, D); NS = 256 (A, B), 64 (C), 16 (D); SW = 9615,4 Hz; Bruker Avance Spektrometer DRX600.

So zeigten die 1D- ^1H -Spektren (Abb. 4.37 C), bzw. ein 2D- ^1H , ^1H -TOCSY-Experiment (Daten nicht gezeigt; Tab. 3.4, Kap. 3.15.3) von RP-HPLC gereinigtem GPdom15ldti einen sehr engen Signalbereich für die Amidprotonen von lediglich 0,8 ppm. Ferner sprach das Fehlen der für den hydrophoben Kern charakteristischen hochfeldverschobenen Signale der Methylpro-

nen sowie der tieffeldverschobenen $H\alpha$ -Resonanzen für Reste der Faltblattelemente, wie sie im Fall von GPdom15 bzw. GPdom15kurz auftraten (Abb. 4.37 D bzw. Abb. 4.13), gegen das Vorliegen einer GPdom15kurz-ähnlichen Struktur. Auch eine Reinigung von GPdom15ldti nur mittels Affinitäts- (Kap. 3.10) und Größenausschlusschromatographie (Kap. 3.7.5.3) ohne denaturierenden RP-HPLC-Schritt führte hier zu keinem anderen Ergebnis (Daten nicht gezeigt).

4.7.1 Oxidative Rückfaltung von GPdom15ldti

Nachdem bei früheren Arbeiten für disulfidverbrückte Proteine ohne biologische Aktivität nach denaturierender Reduktion und anschließender oxidativer Rückfaltung die biologisch aktive Form erhalten wurde (Schulz, 2000), wurde untersucht, ob auf diese Weise (Kap. 3.13) eine Strukturierung von GPdom15ldti induziert werden kann, bzw. ob sich zumindest der strukturierte Anteil erhöhen lässt. Die Reduktion erfolgte hierzu mit der 20 bis 50-fachen Menge DTT (1,4-Dithio-threitol) in 5 bis 50 ml (je nach Proteinmenge) Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer (400 mM, pH 8,3) mit zunächst 3,5 M Guanidiniumchlorid durch Erhitzen des Reaktionsgemisches auf 60 °C für bis zu 18 h. Bei Reinigung des Reduktionsansatzes mittels Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie wurde nur ein Peak mit gegenüber dem unbehandelten, bzw. reoxidierten Protein unterschiedlicher Retentionszeit (höherer Acetonitril-Anteil bei gleichen Elutionsbedingungen) detektiert, was sich auch bei Coinjektion entsprechender Protein-Proben bestätigte (Daten nicht gezeigt).

An einer Probe von in *aqua bidest.* gelöstem GPdom15ldti wurde ferner untersucht, ob nach Reduktion der Cysteine durch DTT-Zugabe und Erhitzen des Reaktionsgemisches auf 60 °C für insgesamt mehr als 24 h strukturelle Veränderungen beobachtet werden können (Abb. 4.37 B), beispielsweise aufgrund von dann gelösten intramolekularen Spannungen, wenn durch die Disulfidverbrückung eine energetisch ungünstige Konformation erzwungen wird. Außer den zusätzlichen Signalen für DTT fanden sich in den NMR-Spektren aber keine weiteren Unterschiede zur unbehandelten Probe (Abb. 4.37 C).

Die oxidative Rückfaltung in Anwesenheit eines Redoxsystems, wie beispielsweise einem Cystein-Cystin-Gemisch, hat sich als günstig erwiesen (Ahmed *et al.*, 1975; Odorzynski & Light, 1979), weshalb das reduzierte Protein (in Konzentrationen von 0,005 bis 0,1 mM) durch Dialyse gegen einen NH_4HCO_3 -Puffer (100 mM, pH 8,3) mit 2 mM EDTA und einem L-Cystein-L,L-Cystin-Gemisch reoxidiert wurde (Kap. 3.13). Bei der Auftrennung der Reoxi-

dationsprodukte mittels RP-HPLC wurden stets drei bis vier überlagerte Peaks erhalten (Abb. 4.38 a), die mit der verwendeten Säule (Kap. 3.7.5.4) auch durch einen sehr flachen Elutionsgradienten (Zunahme des Acetonitrilanteils 0,4 % pro min bei einer Flussrate von 10 ml, Kap. 3.7.5.4) nicht aufgelöst werden konnten (Abb. 3.38). Die Überprüfung der entsprechenden Fraktionen (hier in Abb. 4.38 a, A bis D) mittels NMR-Spektroskopie ließ keine Unterschiede der Spektren untereinander oder gegenüber der 1D- ^1H -Aufnahme von GPdom15ldti vor Reduktion erkennen (Daten nicht gezeigt). Die massenspektrometrische Analyse der einzelnen Fraktionen bestätigte jeweils das theoretisch für das dreifach disulfidverbrückte Protein zu erwartende Molekulargewicht (<http://www.expasy.org>; Gasteiger *et al.*, 2003), ohne dass dabei Hinweise auf das Vorliegen eines Gemisches hätten abgeleitet werden können (Daten nicht gezeigt). Trotz deckungsgleicher NMR-Spektren zeigten die CD-spektroskopischen Aufnahmen (Abb. 4.38 b) gegenüber der Probe vor Reduktion und auch untereinander kleine Unterschiede. So ist der jeweilige Nulldurchgang der reoxidierten Proben gegenüber „unbehandeltem“ GPdom15ldti-Protein (191 nm) zu kleinerer Wellenlänge hin verschoben (186 nm für A und B; 187 nm für C und D), was ebenso wie die nun bei niedrigeren Werten zu beobachtenden Minima mit 198 (A und B) und 201 nm (C und D) auf einen größeren Anteil ohne reguläre Sekundärstrukturelemente hindeutet (Abb. 4.38 b).

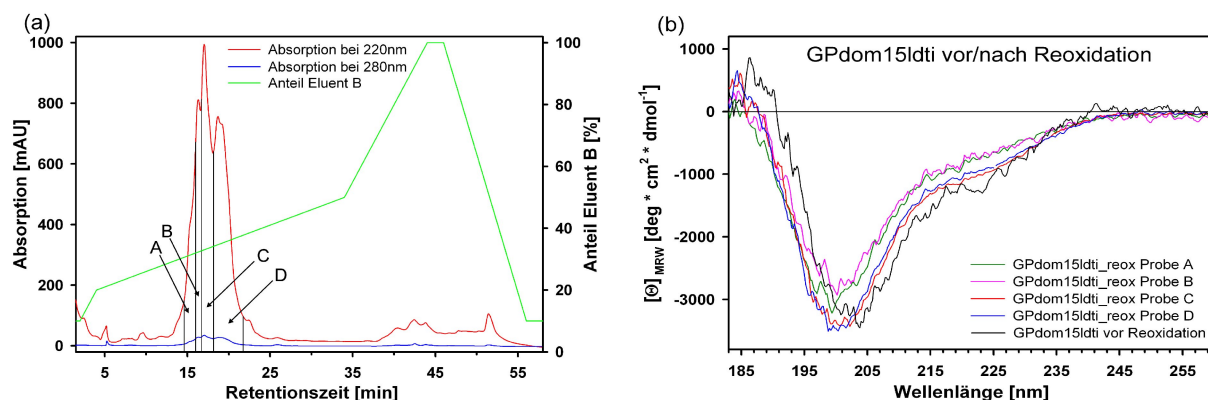


Abb. 4.38: Chromatogramm einer Auftrennung der Reoxidationsprodukte mittels RP-HPLC (a) und Vergleich der Fern-UV-CD-Spektren von GPdom15ldti vor und nach Reoxidation (b)

(a) Elutionsprofil der Reinigung der nach oxidativer Rückfaltung von GPdom15ldti erhaltenen Produkte mittels präparativer RP-HPLC (konstanter Gradient in 30 min 20-50 % Anteil Eluent B; vgl. Kap. 3.7.5.4), Fraktion A: 14,6-16,0 min, B: 16,0-16,7 min, C: 16,7-18,2 min, D: 18,2-21,8 min; (b) Fern-UV-CD-Spektren von GPdom15ldti vor und nach Reoxidation; Proben A bis D aus entsprechender Fraktion von (a), jeweils 35 μM in *aqua bidest.*; gemessen 183 bis 260 nm bei 1 mm Schichtdicke und 25 °C; jeweils 10 Akkumulationen.

4.7.2 Test auf Inhibierung von Serinproteinasen

Während trotz mehrfacher Variation von Reduktionsdauer, eingesetzter Protein- oder DTT-Menge bei der Kontrolle mittels NMR-Spektroskopie in keinem Spektrum Veränderungen oder Hinweise auf eine Strukturierung festgestellt werden konnten, zeigten Proben von reoxidiertem GPdom15ldti überraschenderweise eine Inhibierung von Trypsin. Dadurch war es möglich, den inhibitorisch aktiven Proteinanteil und so die inhibitorische Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_i für Trypsin wie beschrieben (Kap. 4.5.2, 3.12.3) zu bestimmen. Die ermittelten Konstanten unterschieden sich untereinander nur geringfügig von dem für GPdom15 und GPdom15kurz ermittelten K_i -Wert von 0,8 nM, wie hier exemplarisch für Proben, die den Fraktionen 1 bis 5 der Auftrennung eines weiteren Reoxidationsansatzes von GPdom15ldti mittels RP-HPLC entsprechen (Abb. 4.39), aufgeführt (Tab. 4.6).

Tab. 4.6: Übersicht über die inhibitorische Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_i von reoxidiertem GPdom15ldti für Trypsin und Plasmin

GPdom15ldti (reox.)		inhibitorische Konstante K_i [nM]	
Probe (Fraktion)		Trypsin	Plasmin
	1	1,2	≈ 20
	2	1,3	≈ 30
	3	1,3	≈ 20
	4	1,1	≈ 15
	5	0,8	≈ 10

Die K_i -Werte wurden wie in Kap. 3.12.3 beschrieben ermittelt; die Proben 1 bis 5 entsprechen den Fraktionen 1 bis 5 der Auftrennung von reoxidiertem GPdom15ldti mittels RP-HPLC wie in Abb. 4.39 dargestellt; die für Plasmin angegebenen Werte stellen nur ein vorläufiges Ergebnis dar.

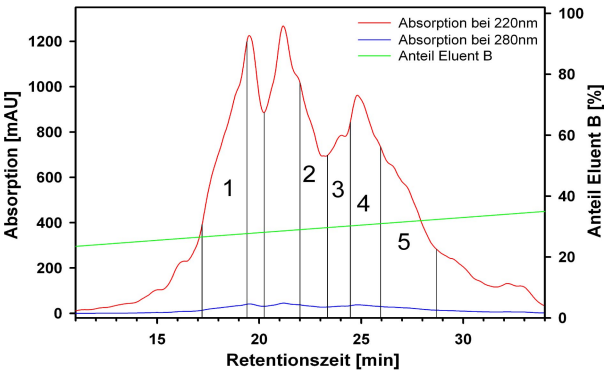


Abb. 4.39: Ausschnitt aus dem Chromatogramm einer Auftrennung von GPdom15ldti nach reoxidativer Rückfaltung mittels RP-HPLC. Elutionsprofil der Reinigung von reoxidiertem GPdom15ldti mittels präparativer RP-HPLC (konstanter Gradient in 60 min 20-50 % Anteil Eluent B; vgl. Kap. 3.7.5.4), Fraktion 1: 17,2-19,4 min, 2: 20,3-22,0 min, 3: 22,0-23,4 min, 4: 24,5-26,0 min, 5: 26,0-28,7 min; Fraktionen 1-5 entsprechen den in Tab. 4.6 aufgeführten Proben 1-5.

Während gegenüber Trypsin noch keine inhibitorische Wirkung von reoxidiertem GPdom15ldti festgestellt werden konnte, zeigten diese Proben jedoch eine starke Hemmung

von Plasmin. Die Affinität zu Plasmin war dabei etwas geringer als für GPdom15 und GPdom15kurz ermittelt (0,5 bzw. 0,8 nM; Kap. 4.5.2), das sich in einem um etwa den Faktor 40 größeren K_i -Wert widerspiegelt. Aufgrund der nur geringen Probenmengen konnten die K_i -Werte noch nicht validiert werden und stellen daher ein nur vorläufiges Ergebnis dar. Eine unterschiedliche Affinität von GPdom15ldti und GPdom15 bzw. GPdom15kurz gegenüber Plasmin kann aber abgeleitet werden. Außerdem wurde eine starke Hemmung durch reoxidiertes GPdom15ldti für die PMN-Elastase aus humanen polymorphkernigen Granulozyten, Subtilisin und Chymotrypsin festgestellt, wobei die exakte Bestimmung der jeweiligen Inhibitionskonstante noch aussteht. Reoxidiertes GPdom15ldti zeigte dabei stets ein kompetitives Verhalten.

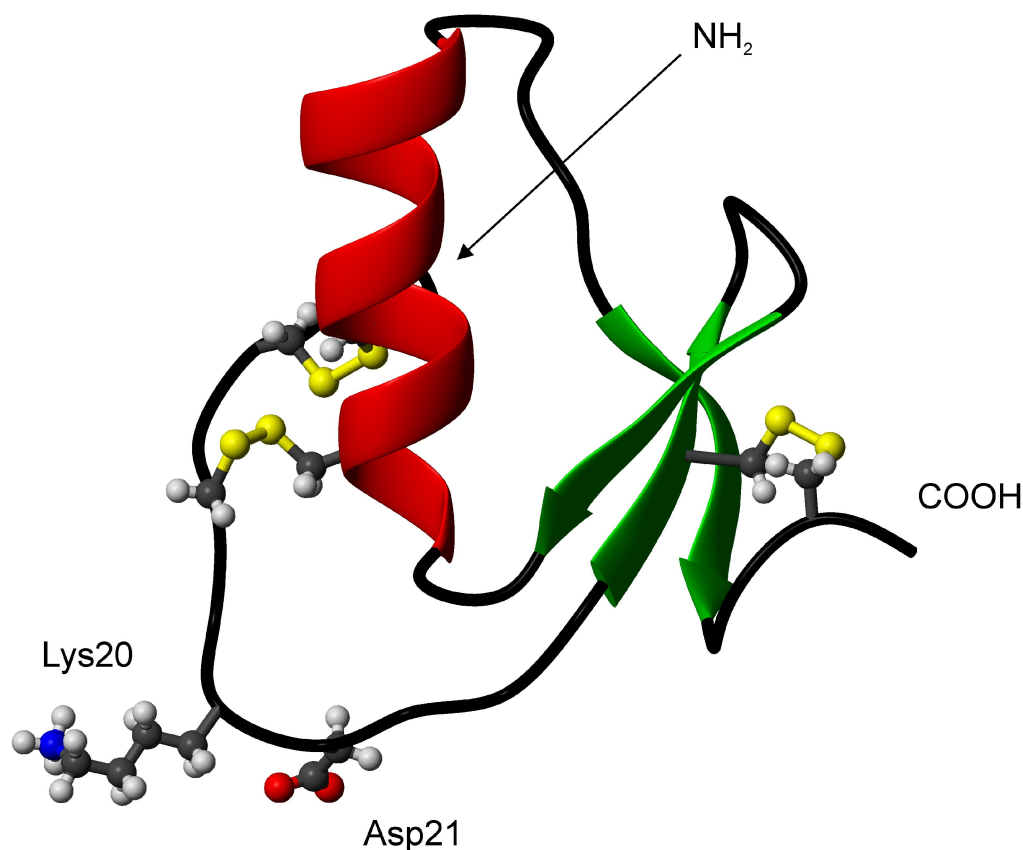


Abb. 4.40: Strukturmodell von GPdom15ldti

Verlauf des Proteinrückgrates und Abschnitte mit regulären Sekundärstrukturelementen der mittels komparativer Molekülmodellierung auf die energieärmste berechnete Struktur für GPdom15kurz nach Energieminimierung mit Hilfe des Programmes SYBYL (Tripos Inc.; Kap. 3.17) erhaltenen Struktur von GPdom15ldti; Seitenketten der Cysteine (5-29; 7-26; 15-47) sowie der Reste in P1- (Lys9) und P1'-Position (Asp10) sind als Kugel-Stabmodell wiedergegeben; Termini sind mit NH_2 und COOH bezeichnet.

Da eine kompetitive Inhibierung von Proteinasen auf das Vorliegen einer kanonischen Konformation der inhibitorischen Schleife schließen lässt (Bode & Huber, 1992), ist davon auszugehen, dass durch die oxidative Rückfaltung eine, vermutlich GPdom15kurz-ähnliche, Strukturierung von GPdom15ldti erreicht wurde. Abb. 4.40 zeigt die erwartete Struktur von GPdom15ldti, die diese Bedingung erfüllen würde und durch komparative Molekülmodellierung (Kap. 3.17) auf die für GPdom15kurz energieärmste berechnete Struktur (Abb. 4.34, Kap. 4.6.8) erhalten wurde. Das Fehlen der dann zu erwartenden Anzeichen in sämtlichen NMR-Spektren auf das Vorliegen eines Proteins mit einer derartig ausgeprägten Tertiärstruktur lässt sich dadurch erklären, dass sich jeweils nur etwa 1 % der Probenmenge von reoxidiertem GPdom15ldti als inhibitorisch aktiv erwiesen hat und dies für eine NMR-spektroskopische Detektion keine ausreichende Menge darstellte. Eine weitergehende Charakterisierung wird daher erst nach Optimierung der Rückfaltungs- und vor allem der Reinigungsbedingungen möglich sein.

5 Diskussion

5.1 Die Bedeutung der LEKTI-Domäne 15

Wie bei genetischen Untersuchungen von Patienten mit Netherton Syndrom herausgefunden wurde, weisen diese Mutationen im sogenannten SPINK5-Gen auf, die einen vorzeitigen Stop der Translation zur Folge haben (Bitoun *et al.*, 2002 b; Chavanas *et al.*, 2000). Dadurch wird das vom SPINK5-Gen kodierte 1064 Aminosäure große und in 15 Domänen eingeteilte Vorläuferprotein LEKTI (Mägert *et al.*, 1999) nicht im vollem Umfang gebildet (Bitoun *et al.*, 2002 b), während bei Menschen ohne Netherton Syndrom die vollständige LEKTI-mRNA und das gesamte Vorläuferprotein aber auch einzelne Fragmente hiervon gefunden wurden (Ahmed *et al.* 2001; Bitoun *et al.*, 2003; Komatsu *et al.*, 2002; Mägert *et al.*, 1999).

Inzwischen gibt es konkrete Hinweise (Ahmed *et al.* 2001; Bitoun *et al.*, 2003; Komatsu *et al.*, 2002; Mitsudo *et al.*, 2003) für eine Prozessierung von LEKTI in einzelne Domänen in der Haut, die dann vermutlich eine regulatorische Funktion gegenüber Zell-Zell-Verbindungen auflösenden Proteinasen übernehmen (Komatsu *et al.*, 2002). Hierfür spricht auch die gegenüber gesunden Menschen erhöhte Trypsin-artige Enzymaktivität in Hautzellen von Patienten mit Netherton Syndrom (Komatsu *et al.*, 2002) und die signifikante Hemmung von Trypsin durch die Domänen 5, 6 und 8 (Mägert *et al.*, 1999, 2002 a), durch das vollständige LEKTI-Vorläuferprotein (Mitsudo *et al.*, 2003) sowie das Fragment 6-9', das die Domänen 6-8 komplett und von der 9. Domäne die erste Hälfte umfasst (Glu356-Asn598; vgl. Abb. 1.2; Jayakumar *et al.*, 2004).

Die beim Netherton Syndrom beobachteten Symptome (Hypereosinophilie, hohe IgE-Konzentrationen im Blut, Prädisposition für Asthma) deuten aber auch auf eine unzureichende Regulierung der Tryptaseaktivität hin (Mägert *et al.*, 1999, 2002 a, b; Schechter *et al.*, 1998), da Tryptase nicht nur eine verstärkende Wirkung bei der Immunantwort zeigt (Schechter *et al.*, 1998) sondern auch als Mediator für Asthma fungiert (Rice *et al.*, 1998). Aufgrund einer nicht erkennbaren Korrelation zwischen Ausprägtheit der Symptome und der noch gebildeten Anzahl an LEKTI-Domänen, des Fehlens von Domäne 15 bei, soweit bekannt, allen Patienten mit Netherton Syndrom (Bitoun *et al.*, 2002 b; Sprecher *et al.*, 2001) sowie der hohen Sequenzhomologie zwischen dem bislang einzigen bekannten natürlich vorkommenden Trypsase-Inhibitor LDTI und Domäne 15 (Abb. 4.13; Auerswald *et al.*, 1994; Sommerhoff *et al.*, 2000), ist von einer zentralen Bedeutung der 15. Domäne beim Krankheitsbild Netherton Syndrom auszugehen.

Die LEKTI-Domäne 15 sollte daher in der vorliegenden Arbeit funktionell und strukturell nä-

her charakterisiert werden.

5.2 Expression und Reinigung der LEKTI-Domäne 15-Varianten

Im Gegensatz zu den LEKTI-Domänen 1 (HF6478), 5 (HF7072) und 6 (HF7665), die aus menschlichem Hämofiltrat in für eine weitere Charakterisierung ausreichenden Mengen gewonnen werden konnten (Mägert *et al.*, 1999, 2002 a, b), konnte die 15. Domäne bislang noch nicht aus natürlichem Material isoliert werden. Für Untersuchungen der biologischen Aktivität und eine strukturelle Charakterisierung mittels NMR-Spektroskopie war es daher notwendig, ein geeignetes Expressionssystem zu entwickeln, das die Herstellung ausreichender Mengen rekombinanten Proteins erlaubte. Zwar gibt es konkrete Hinweise auf eine mögliche Spaltung von LEKTI durch in der Haut vorkommende Proteinasen (Komatsu *et al.*, 2002; Mitsudo *et al.*, 2003), der genaue natürliche Sequenzabschnitt der LEKTI-Domäne 15 ist aber bis heute nicht bekannt. So wurde der Bereich Asp989-Glu1064 mit vier Aminosäuren vor dem ersten Cystein und dem, der von Mägert *et al.* (1999) beschriebenen cDNA entsprechend, vollständigen carboxyterminalen Abschnitt als zu klonierender Abschnitt ausgewählt (vgl. Abb. 1.3; Swiss-Prot-Datenbank: Q9NQ38; Boeckmann *et al.*, 2003; TrEMBL-Datenbank: AJ228139; Apweiler *et al.*, 2004). Im Vergleich mit der Aminosäuresequenz bekannter Kazalinhhibitoren, insbesondere der von LDTI mit nur drei Resten vor dem ersten Cystein (vgl. Abb. 4.13; Sommerhoff *et al.*, 1994), waren neben der möglichen Schwierigkeiten beim Zuordnen von NMR-Signalen sich wiederholender identischer Aminosäuren (Wüthrich, 1986, Abb. 1.2) hierfür ausschlaggebend. Damit umfasst der ausgewählte Sequenzbereich (ab Asp989) zwar nicht den Abschnitt, wie er aufgrund der potentiellen SPC-Schnittstelle zwischen Domäne 14 und 15 zu erwarten wäre (ab Ala975; Abb. 1.2; Kap. 1.4), ein Einfluss dieser 13 aminoterminalen Reste auf die biologische Funktion ist jedoch wenig naheliegend. So ergab eine Sequenzanalyse für diesen 13 Aminosäuren langen Abschnitt mittels ScanProsite (<http://www.expasy.org/tools/scanprosite>; Gattiker *et al.*, 2002 b; Hulo *et al.*, 2004) bzw. mit Hilfe des ProfileScan Servers (<http://hits.isb-sib.ch/cgi-bin/PFSCAN>; Falquet *et al.*, 2002) weder Hinweise auf eine Funktion, noch auf das Vorliegen regulärer Sekundärstrukturelemente (ExPASy-Server; <http://www.expasy.org>; Gasteiger *et al.*, 2003). Eine entsprechende Überprüfung wurde auch für den carboxyterminalen Bereich durchgeführt (Kap. 5.5).

Beide Domäne 15-pET32a-Vektor-Konstrukte, die sich nur hinsichtlich der Proteinase-Schnittstelle, für Enterokinase bzw. PreScission, unterschieden, zeigten in den beiden jeweils

getesteten *E. coli*-Stämmen AD494(DE3) und Origami(DE3), die aufgrund ihrer Thioredoxin-Reduktase-Defizienz (*trxB*⁻; Derman *et al.*, 1993; Prinz *et al.*, 1997) ein oxidatives Milieu im Cytoplasma besitzen und die Ausbildung der korrekten Disulfidverbrückung durch den Thioredoxin-Anhang begünstigen (Stewart *et al.*, 1998), nach Induktion gleich hohe Expressionsraten. Für eine Bevorzugung des Stammes *E. coli* Origami(DE3) sprachen dabei die höheren Ausbeuten bezüglich des Nasszellgewichtes (Kap. 4.2.1). Entsprechend der für Thioredoxin-Fusionsproteine erwarteten guten Löslichkeit (LaVallie *et al.*, 1993) befand sich das gebildete Fusionsprotein nach Aufschluss der Zellen nahezu vollständig im Überstand und konnte aufgrund der Hexa-Histidin-Sequenz, die sich zwischen Thioredoxin und Proteinase-Schnittstelle befindet, mittels auf Cobalt-Ionen basierender Affinitätschromatographie aus dem Rohextrakt isoliert werden (Porath, 1992; Kap. 4.3.1). Obwohl bei der Abspaltung des Fusionsanhangs durch PreScission gegenüber der gewünschten Proteinsequenz Glycin und Prolin als zusätzliche aminoterminal Aminosäuren resultieren, wurde hierfür die PreScission eingesetzt, da diese gegenüber Enterokinase eine deutlich effizientere Umsetzung des Fusionsproteins zeigte (Kap. 4.3.2). Nach Spaltung und Abtrennung des Fusionsanhangs mittels erneutem Affinitätschromatographieschritt wurde als abschließender Reinigungsschritt, nachdem keine negativen Auswirkungen auf die Strukturierung festgestellt werden konnten, eine Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC) durchgeführt, wodurch GPdom15 als hochreines Protein erhalten wurde (Kap. 4.2.4).

Die Expressions- und Reinigungsstrategie war auch zur Gewinnung der LEKTI-Domäne 15-Varianten GPdom15kurz und GPdom15ldti geeignet

Mit Hilfe des gleichen Expressionssystems und Reinigungsprotokolls, wie zur Gewinnung von GPdom15 eingesetzt, konnten auch ausreichende Proteinmengen der beiden Domäne 15-Varianten GPdom15kurz, das die LEKTI-Reste Asp989 bis Glu1047 umfasst (Abb. 1.2; Kap. 4.1.2), und GPdom15ldti, bei dem der gesamte Bereich Lys994 bis Leu1005 von GPdom15kurz durch ein Alanin ersetzt ist (Kap. 4.1.2), gewonnen werden. Bei einem Nasszellgewicht von jeweils etwa 2,6 g pro Liter Kulturmedium wurden sowohl für GPdom15 als auch für GPdom15kurz und GPdom15ldti etwa 40 mg Fusionsprotein und ca. 9 mg Protein erhalten. Die Ausbeute liegt damit geringfügig über der von Lauber *et al.* (2001) für die LEKTI-Domäne 1 bestimmten Menge von knapp 30 mg Fusionsprotein pro Liter Medium und deutlich über der vor kurzem von Kreutzmann *et al.* (2004) beschriebenen Ausbeute von 630 µg an rekombinanter LEKTI-Domäne 6 pro Liter Kulturmedium.

Die verwendete Expressions- und Reinigungsstrategie erlaubte es außerdem, durch Expressi-

on in Minimal-Medium, das als einzige Stickstoffquelle ^{15}N -Ammoniumchlorid enthielt, mit dem NMR-aktiven Isotop ^{15}N angereichertes GPdom15- bzw. GPdom15kurz-Protein bei nur geringfügig geringerer Ausbeute herzustellen (Kap. 4.3). Die ^{15}N -Markierung von GPdom15 und GPdom15kurz war zur Durchführung dreidimensionaler NMR-Experimente erforderlich, um die für die Strukturrechnung notwendige eindeutige Zuordnung der Resonanzen zu erzielen (Kap. 4.6.3.1). Eine Bildung von unlöslichen Aggregaten, die oftmals ein Hinweis auf eine nicht korrekte Disulfidverbrückung ist (Mitraki & King, 1989), wurde bei keinem Schritt der Proteingewinnung beobachtet.

Für GPdom15 wurde die korrekte Abfolge der ersten sechzehn Aminosäuren sowie die vermutete P1-P1'-Position durch aminoterminaler Sequenzierung verifiziert (Kap. 4.6.8) und das theoretisch zu erwartende Molekulargewicht mittels MALDI-Massenspektrometrie nachgewiesen (Kap. 4.4). Außerdem wurde die theoretisch zu erwartende molekulare Masse von GPdom15 und auch die der beiden anderen Domäne 15-Varianten durch Aufnahme von ESI-Massenspektren bestätigt (Kap. 4.4.1).

5.3 Analyse der Sekundärstruktur der LEKTI-Domäne 15-Varianten mittels CD-Spektroskopie

Die Analyse von Proteinen in Lösung mittels CD-Spektroskopie erlaubt eine Ableitung der Anteile von regulären Sekundärstrukturelementen, wobei die Fern-UV-CD-Aufnahmen als eine Linearkombination von Basisspektren der unterschiedlichen Sekundärstrukturelementtypen betrachtet werden und so deren Beitrag berechnet werden kann (z.B. Schmid 1989). Nachdem der Einfluss von Disulfidbrücken, die eine stark negative Elliptizität bei Wellenlängen kleiner 210 nm zeigen (Takagi & Ito, 1972), sowie der Beitrag der aromatischen Aminosäuren Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan (Chakrabarty *et al.*, 1993; Woody, 1978; Woody, 1994) auf das CD-Signal nicht immer erfasst werden können, kann dies bei der Evaluierung der Spektren zu einer falschen Gewichtung der Anteile der Sekundärstrukturelemente führen (Greenfield, 1996; Sreerama & Woody, 1993). Nachdem die LEKTI-Domäne 15-Varianten ein bzw. drei Tyrosine und drei Disulfidbrücken aufweisen, könnte dies eine mögliche Ursache für die Überbewertung des Faltblatt-Anteils (ca. 60 %; Kap. 4.4.2) bezogen auf die experimentell bestimmte Struktur von GPdom15kurz (ca. 15 %; Kap. 4.6.8) durch die beiden Programme *spectra evaluation* (Jasco, Großumstadt) und *CDPro* (Sreerama *et al.*, 2001) darstellen.

Eine zuverlässigere Berechnung der Anteile an Sekundärstrukturelementen sollte mit Pro-

grammen möglich sein, die zur Konformationsanalyse nur auf Referenzspektren von Proteinen mit ähnlichen spektroskopischen Eigenschaften zurückgreifen (Greenfield, 1996).

Die CD-Spektren der LEKTI-Domäne 15-Varianten ähneln denen strukturell bekannter Kazalvertreter

In der Literatur finden sich jedoch nur wenige Beispiele einer CD-spektroskopischen Charakterisierung von Inhibitoren des Kazaltyps, deren dreidimensionale Struktur bekannt ist, und daher eine geeignete Vergleichsmöglichkeit bieten. Bei bislang etwa 50 in der Proteindatenbank (<http://www.rcsb.org/pdb>; Berman *et al.*, 2000) hinterlegten Strukturen für rund 10 verschiedene Kazaltypen (nach SCOP-Datenbank; <http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop>; Murzin *et al.*, 1995; ohne die LEKTI-Domäne 6) sind bisher Fern-UV-CD-Aufnahmen für die zweite und dritte Domäne des Ovomucoid-Inhibitors aus Hühnereiweiß (Watanabe *et al.*, 1981), für den Trypsininhibitor PSTI aus der Bauchspeicheldrüse (*pancreatic secretory trypsin inhibitor*) vom Schwein (*Sus scrofa*; Menegatti *et al.*, 1981) sowie für den Tryptaseinhibitor LDTI (Auerswald *et al.*, 1994) verfügbar.

Die CD-Spektren des Trypsininhibitors PSTI vom Rind und Schwein unterscheiden sich kaum (Menegatti *et al.*, 1981; Menegatti *et al.*, 1983) und zeigen eine große Ähnlichkeit zu den Fern-UV-CD-Aufnahmen von GPdom15 bzw. der COOH-terminal verkürzten LEKTI-Domäne 15-Variante GPdom15kurz (Abb. 4.11), obgleich nach der Einteilung von Kabsch und Sander (1983) der Helix- und Faltblattanteil bei PSTI vom Schwein (PDB: 1tgs; Bolognesi *et al.*, 1982) 16 % und 13 %, bei GPdom15kurz aber 24 % und 15 % betragen (Kap. 4.6.8).

Ebenso wie bei GPdom15kurz ist beim PSTI ein Minimum der mittleren molaren Elliptizität bei 206 nm und ein weiteres lokales, nur schwach ausgeprägtes Minimum bei 218 nm zu beobachten (Menegatti *et al.*, 1981, 1983). Leider erlauben die CD-Spektren von PSTI und auch der Ovomucoid-Inhibitoren keinen Vergleich hinsichtlich der Lage des Nulldurchganges bzw. des Maximums, da jeweils nur der Wellenlängenbereich größer 200 nm wiedergegeben ist. Bei der Interpretation der Fern-UV-CD-Aufnahme von LDTI, die gegenüber GPdom15kurz eine deutlich stärker ausgeprägte Schulter (218 nm) bei sonst ähnlichen Wellenlängen für Maximum (190 nm), Nulldurchgang (194 nm) und Minimum (208 nm) der mittleren molaren Elliptizität zeigt (Auerswald *et al.*, 1994), wurde wie hier für die LEKTI-Domäne 15-Varianten (Kap. 4.4.2) und auch schon für die drei Domänen des Ovomucoid-Inhibitors (Watanabe *et al.*, 1981) der Faltblattgehalt mit jeweils rund 50 % ebenfalls deutlich überbewertet. Den Kris-

tallstrukturen nach liegt er für die zweite Domäne (PDB: 1r0t; Ibrahim & Pattabhi, 2004) bei 18 % und für die dritte Domäne (PDB: z.B. 1ovo; Papamokos *et al.*, 1982) sowie bei LDTI (PDB: 1ldt; Stubbs *et al.*, 1997) bei jeweils etwa 13 %.

Eine rein qualitative Analyse der Fern-UV-CD-Spektren von GPdom15 und GPdom15kurz lässt auf helikal und faltblattartig strukturierte Bereiche bei einem großen Anteil ohne reguläre Sekundärstruktur schließen (Kap. 4.4.2), der bei GPdom15ldti vermutlich aufgrund einer in der vorliegenden Form nicht korrekten Disulfidverbrückung (Kap. 5.7) noch stärker dominiert. Die CD-Aufnahmen bestätigen demnach bei einer hohen Ähnlichkeit zu den CD-Spektren strukturell bekannter Inhibitoren vom Kazaltyp das Vorliegen der für Kazalvertreter typischen Sekundärstrukturelemente (Kap. 5.4; Bode & Huber, 1992; Krowarsch *et al.*, 2003).

Die LEKTI-Domäne 15 zeigt eine hohe Stabilität gegenüber Temperatur und pH-Wert

Auch wenn, wie hier im Fall der LEKTI-Domäne 15-Varianten, die Anteile der regulären Sekundärstrukturelemente anhand der Fern-UV-CD-Aufnahmen nicht exakt quantifiziert werden können, kann der Einfluss verschiedener Faktoren auf die Proteinstruktur, wie Temperatur oder pH-Wert, dennoch mittels vergleichender CD-Spektroskopie erfasst werden (Schmid, 1989). Bei der Untersuchung der Abhängigkeit vom pH-Wert zeigten die LEKTI-Domäne 15-Varianten keine strukturellen Änderungen für den gesamten getesteten Bereich (pH 4,5 bis 9,0; Kap. 4.4.2), so dass für die weitere NMR-spektroskopische Strukturaufklärung von GPdom15 ein hierfür günstiger pH-Wert gewählt werden konnte. Die schließlich verwendete Pufferlösung (pH 6,4) stellt einen Kompromiss zwischen Löslichkeit (theoretischer pI-Wert: 5,24; Kap. 4.6.1.3), physiologischem pH-Wert (7,4) und einer noch ausreichend geringen Austauschrate der Amidprotonen (Wüthrich, 1986) dar (Kap. 4.6.1.3), und wurde zur besseren Vergleichbarkeit auch für die NMR-Proben der COOH-terminal verkürzten Variante (theoretischer pI-Wert: 6,89) eingesetzt (Kap. 3.15.3).

Neben der konformationellen Stabilität über einen großen pH-Bereich, die auch von anderen disulfidverbrückten Serinproteinase-Inhibitoren, wie beispielsweise von dem Chymotrypsininhibitor SPCI (*schizolobium parahyba chymotrypsin inhibitor*) aus einer südamerikanischen Laubbaumart (*Schizolobium parahyba*; Teles *et al.*, 2004), bekannt ist, wurde für die 15. LEKTI-Domäne eine hohe Thermostabilität festgestellt. So waren aus den aufgenommenen Schmelzkurven kein thermischer Übergang ableitbar sowie keine Unterschiede der bei einer Temperatur von 100 °C gegenüber den bei 20 °C (vor und nach dem Erhitzen) durchgeführten Messungen feststellbar (Kap. 4.4.2). Eine ähnlich hohe Stabilität wurde für den PSTI

vom Schwein beschrieben, der bei einem pH von 5,5 auch nach mehr als sechs Stunden bzw. der vom Rind nach mehr als einer Stunde bei 85 °C keine Veränderungen im CD-Signal gegenüber den bei 25 °C untersuchten Proben zeigte (Menegatti *et al.*, 1981; Menegatti *et al.*, 1983). Eine derart hohe Stabilität ist hauptsächlich auf die Disulfidbrücken zurückzuführen, wie Untersuchungen mit dem Trypsininhibitor BPTI (*bovine pancreatic trypsin inhibitor*) aus der Bauchspeicheldrüse vom Rind, ein Serinproteinase-Inhibitor vom Kunitz-Typ (Bode & Huber, 1992), im reduzierten Zustand bzw. von entsprechenden Mutanten mit substituierten Cysteinen zeigten (z.B. Hagihara *et al.*, 2002; Hurle *et al.*, 1990; Moses & Hinz, 1983; Schwarz *et al.*, 1987). Daneben wurde auch für Mutationen im hydrophoben Kern eine stark destabilisierende Wirkung auf die gesamte Struktur festgestellt (Beeser *et al.*, 1997; Xie *et al.*, 1997).

Nachdem die LEKTI-Domäne 15 der CD-spektroskopischen Analyse nach reguläre Sekundärstrukturelemente aufwies und eine hohe Stabilität zeigte, wie es für Serinproteinase-Inhibitoren üblich ist (Krokoszynska & Otlewski, 1996), sollte die Domäne 15 für ein besseres Verständnis ihrer noch unbekannten biologischen Funktion strukturell aufgeklärt werden, wobei aufgrund ihrer Größe und guten Löslichkeit sich die NMR-Spektroskopie hierfür als geeignet erwies.

5.4 Die Struktur von GPdom15 und GPdom15kurz in Lösung

Günstige Voraussetzungen für die Gewinnung einer ausreichenden Menge eindeutiger Distanzvorgaben und Winkелеinschränkungen für die spätere Strukturberechnung von Proteinen bieten Spektren, die neben einem sehr hohen Signal-Rausch-Verhältnis eine dem Molekulargewicht entsprechende einheitliche Linienbreite und vor allem eine hinreichend große Dispersion der Resonanzen aufweisen (Rehm *et al.*, 2002; Wüthrich, 1986). Daher sollte zunächst anhand von 1D-¹H-Experimenten geklärt werden, inwiefern GPdom15 in der vorliegenden Form für eine Strukturaufklärung mittels NMR-Spektroskopie geeignet war. Die 1D-Spektren von GPdom15 zeigten eine hohe spektrale Dispersion von knapp 10 ppm mit einzelnen stark hoch- bzw. tieffeldverschobenen Signalen (Kap. 4.6.1.1), wie es für Proteine mit ausgeprägter Sekundär- und Tertiärstruktur charakteristisch ist (Wüthrich, 1986, Wishart *et al.*, 1991), und ließen auch für die höher konzentrierte Probe (2,5 mM) keinen negativen Einfluss wie etwa Aggregationsphänomene erkennen (Kap. 4.6.1.1). Trotzdem war eine eindeutige Identifizierung bzw. Zuordnung der Resonanzen in den homonuklearen zweidimensionalen Spektren

nicht nur für die Aminosäuren mit Verschiebungen, wie sie für unstrukturierte Proteine (*random coil*) festgestellt werden, durch Signalüberlapp erheblich erschwert (Kap. 4.6.1.2). So finden sich beispielsweise im Bereich 8,20 bis 8,30 ppm die Amidprotonen und damit die Signalleitern von 12 Resten (Abb. 4.19; vgl. Anhang, Kap. 10.2). Mit Hilfe von ^{15}N -editierten NMR-Experimenten, bei denen die Auftrennung der Resonanzsignale entlang der Frequenzachse der Stickstoffkerne genutzt wird, war zwar eine sequenzspezifische Zuordnung für einen Großteil der Reste vor allem des Proteinrückgrates möglich (Kap. 4.6.1.5), der Informationsgehalt reichte aber dennoch für die Auflösung von Mehrdeutigkeiten insbesondere im Resonanzbereich der Seitenkettenprotonen nicht aus, wie es für die Berechnung einer hochaufgelösten Struktur notwendig gewesen wäre (Kap. 4.6.1.4). Über eine erschwerte Zuordnung der Signale in homonuklearen 2D-NMR-Experimenten aufgrund von starkem spektralen Überlapp wurde auch von Klaus und Schomburg (1993) für den strukturell sehr ähnlichen, mit 56 Resten aber deutlich kleineren Trypsininhibitor PSTI aus der menschlichen Bauchspeicheldrüse berichtet, der gegenüber GPdom15 zwar zwei Reste mehr vor dem ersten Cystein aufweist, aber mit dem sechsten Cystein endet.

Die vollständige Zuordnung der NOE-Kreuzsignale wurde erst mit Hilfe der COOH-terminal verkürzten Variante GPdom15kurz erreicht

Nachdem für den 15 Aminosäuren umfassenden Bereich des COOH-Terminus keine Hinweise auf das Vorliegen regulärer Strukturelemente abgeleitet werden konnte (Kap. 4.6.2), nur wenige Kazalvertreter der in der MEROPS-Datenbank (<http://merops.sanger.ac.uk>; Rawlings *et al.*, 2004 a, b) hinterlegten Primärsequenz nach mehr als eine Aminosäure nach dem letzten Cystein aufwiesen (Abb. 4.27; Abb. 5.1), der natürliche Sequenzabschnitt der 15. LEKTI-Domäne nicht bekannt ist und durch das Entfernen von unstrukturierten Bereichen die Qualität und die Interpretierbarkeit von Spektren oftmals erhöht werden kann (z.B. Lehmann *et al.*, 2004), war für eine entsprechend COOH-terminal verkürzte GPdom15-Variante deutlich weniger Signalüberlapp ohne negative Auswirkungen auf die Struktur zu erwarten. Außerdem war diese GPdom15-Variante auch hinsichtlich der Möglichkeit zur Untersuchung einer eventuellen biologischen Funktion des COOH-terminalen Bereichs der 15. LEKTI-Domäne von Interesse (Kap. 5.5), die analog der unverkürzten Variante hergestellt werden konnte (Kap. 4.3).

Die NMR-Spektren der nur den LEKTI-Bereich Asp989-Glu1047 umspannenden Variante GPdom15kurz zeigten erwartungsgemäß eine deutlich geringere Signaldichte im Bereich von 8,6 bis 7,8 ppm (Abb. 4.19), wobei das übereinstimmende NOE-Muster der übrigen Resonan-

zen gegenüber den Aufnahmen von GPdom15 das Vorliegen einer identischen Tertiärstruktur für den gemeinsamen Sequenzbereich von GPdom15 und GPdom15kurz bestätigte. Mit Hilfe der Zuordnung für GPdom15kurz konnten schließlich die restlichen Resonanzen für GPdom15 zugeordnet und eine ausreichende Menge an eindeutigen Randbedingungen abgeleitet werden, die die Grundlage für die Berechnung einer hochaufgelösten Struktur darstellten.

Für die Strukturberechnung ist die Kenntnis des Disulfidmusters von Vorteil, da dann der Abstand der Schwefelatome, die in eine Disulfidbrücke einbezogen sind, als zusätzliche stark gewichtete Distanzbeschränkung vorgegeben werden kann.

Die LEKTI-Domäne 15 zeigt das Disulfidmuster eines Kazalinhitors

Die massenspektrometrische Analyse lässt auf die Einbindung aller Cysteine in Disulfidbrücken für alle drei rekombinant hergestellten Domäne 15-Varianten schließen (Kap. 4.4.1), und über charakteristische NOE-Kreuzresonanzen zwischen den α - und β -Protonen der Cysteine (Klaus *et al.*, 1993) konnte das Disulfidmuster für GPdom15 bzw. GPdom15kurz eindeutig abgeleitet werden, das durch die Homogenität der Spektren (Kap. 4.6.5) und die Analyse von Strukturen, die ohne vorgegebene Disulfidverbrückung berechnet wurden (Kap. 4.6.8), bestätigt wird.

Dies zusammen verifiziert im Fall von GPdom15 bzw. GPdom15kurz das von Mägert *et al.* (1999) aus Homologiegründen vorgeschlagene 1-5/2-4/3-6-Verbrückungsmuster für die LEKTI-Domäne 15, wie es für Inhibitoren vom Kazaltyp charakteristisch ist (Abb. 4.27; Kap. 4.6.5; Greene & Bartlett, 1969; Laskowski & Kato, 1980).

Erwähnenswert ist die für Cys37 beobachtete starke Hochfeldverschiebung des α - und eines β -Protons gegenüber den entsprechenden in der BMRB-Datenbank aufgeführten mittleren Verschiebungen (Kap. 4.6.2, 4.6.8). Dies scheint für disulfidverbrückte Inhibitoren jedoch nicht ungewöhnlich, da bereits bei mehreren Kazalvertretern, wie beispielsweise bei dem Thrombin-Inhibitor Dipetalin (Schlott *et al.*, 2002), oder BUSI (*bull seminal plasma inhibitor*; Williamson *et al.*, 1985), bzw. bei strukturell homologen Inhibitoren wie dem Trypsininhibitor ATI aus der Seescheide (*Halocynthia roretzi*; *ascidian trypsin inhibitor*; Hemmi *et al.*, 2002) oder dem ATT_P aus der Acker-Schmalwand (*Arabidopsis thaliana trypsin inhibitor precursor*; Zhao *et al.*, 2002) gerade für das am Anfang der zentralen α -Helix lokalisierte Cystein eine ähnlich extreme Hochfeldverschiebung der α - und/oder β -Protonen festgestellt wurde, ohne dass dies beispielsweise auf einen Ringstromeffekt einer benachbarten aromati-

schen Seitenkette hätte zurückgeführt werden können. Die starke Hochfeldverschiebung nur eines der beiden β -Protonen von Cys37, das Fehlen von dann zu erwartenden NOE-Signalen sowie die große Distanz ($>5 \text{ \AA}$) zu den aromatischen Seitenketten von Tyr8 und Tyr16 in allen 31 akzeptierten Strukturen von GPdom15 und GPdom15kurz sprechen auch hier gegen einen Ringstrom-Effekt als Ursache (Wüthrich, 1986). Möglicherweise ist die starke Hochfeldverschiebung des α - und eines β -Protons von Cys37, die auf eine starke Abschirmung durch eine erhöhte Elektronendichte hindeutet (z.B. Wishart *et al.*, 1995), auf die räumliche Nähe zu der Disulfidbrücke Cys5-Cys40 zurückzuführen, wie analog von Hemmi *et al.* (2003) im Fall von ATI als Ursache vermutet.

Die Strukturen von GPdom15 bzw. GPdom15kurz sind gut definiert

Neben der Vorgabe der Prolinkonformation (s.u.) und einem festen Abstand der Schwefelatome von $2,02 \pm 0,1 \text{ \AA}$ wurden für die abschließenden Strukturberechnungen nach der *simulated annealing*-Strategie (Nilges *et al.*, 1996) von GPdom15kurz bzw. GPdom15 insgesamt 887 bzw. 908 experimentelle Randbedingungen verwendet, die zu einer hoch aufgelösten Struktur mit einer mittleren Abweichung der Atomkoordinaten für die schweren Rückgratatomme für GPdom15kurz (Asp1-Glu59) von nur $0,60 \text{ \AA}$ bzw. $1,14 \text{ \AA}$ für alle schweren Atome führten. Aufgrund des flexiblen (ps-ns-Zeitskala; Kap. 4.6.6) und daher weniger gut definierten COOH-terminalen Bereichs (Abb. 4.31) liegen die entsprechenden RMSD-Werte für GPdom15 (Asp1-Glu76) bei $3,90 \text{ \AA}$ bzw. $4,12 \text{ \AA}$, die sich aber bei Berücksichtigung nur des Sequenzbereiches Ser2-Cys58 auf $0,54 \text{ \AA}$ bzw. $1,05 \text{ \AA}$ reduzieren (Tab. 4.5, Kap. 4.6.7).

Sehr ähnliche Werte wurden bei Ausschluss der unstrukturierten Bereiche beispielsweise für die LEKTI-Domänen 1 ($0,57 \text{ \AA}$ bzw. $0,99 \text{ \AA}$) und 6 ($0,62 \text{ \AA}$ bzw. $1,13 \text{ \AA}$; Lauber *et al.*, 2003) oder auch für die von Song *et al.* (2003) bestimmte Struktur eines 56 Reste umfassenden OMTKY3-Vertreterers ($0,58 \text{ \AA}$ bzw. $1,15 \text{ \AA}$) erhalten.

Die Struktur von GPdom15 bzw. GPdom15kurz weist alle Elemente eines typischen Kazalinhinhibitors auf

Zwar ließ bereits das Kazal-artige Disulfidverbrückungsmuster vermuten (Mägert *et al.*, 1999), dass es sich bei der 15. LEKTI-Domäne trotz der gegenüber klassischen Kazalinhinhibitoren zusätzlichen Aminosäuren zwischen den ersten beiden Cysteinen um einen Kazalvertreter handeln könnte, aber erst die ermittelte Struktur von GPdom15 bzw. GPdom15kurz bestätigte, dass alle Strukturelemente eines typischen Kazalinhinhibitors vorhanden sind (Bode & Huber, 1992; Krowarsch *et al.*, 2003; Laskowski & Kato, 1980). Neben den drei Disulfidbrücken in

der entsprechenden 1-5/2-4/3-6-Verknüpfung zeigen beide Domäne 15-Varianten eine zentrale α -Helix (Cys37 bis Arg46). Die Analyse der beiden Domäne 15-Strukturen GPdom15kurz (PDB: 1uvf) und GPdom15 (PDB: 1uvg) mit dem Programm PROMOTIF (Hutchinson & Thornton, 1996) ergab für Pro36, für das fast 40 NOEs gefunden wurden (Abb. 4.31), in nur knapp 16 % der jeweils 31 energieärmsten Strukturen eine helikale, sonst eine *turn*-artige Konformation, so dass von einem Beginn der Helix ab Cys37 ausgegangen wurde (Kap. 4.6.8). Da je nach Datenbank die Angaben über die Abschnitte mit regulären Sekundärstrukturelementen abweichen können, wurden zur besseren Vergleichbarkeit die ebenfalls mit PROMOTIF abgeleiteten strukturierten Bereiche von einigen Kazalvertretern, wie sie in der PDBsum-Datenbank (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/pdbsum>; Laskowski, 2001; Laskowski *et al.*, 1997; Luscombe *et al.*, 1998) hinterlegt sind, angegeben (Abb. 5.1). Pro36 sollte bei GPdom15kurz bzw. GPdom15 der NOE-Kontaktkarte entsprechend in die Helix miteinbezogen sein (Kap. 4.6.3.4), wie auch bei den meisten anderen Kazalvertretern (z.B. OMSVP3, Hemmi *et al.*, 2003) die Helix bereits eine Aminosäure vor dem vierten Cystein beginnt und ebenfalls meist 10 Reste umfasst (Abb. 5.1).

	P17 P1'	
1uvf	-----DSEMCKDYRVL-----PRIGYLCPKDLKPVCGDDGDTYNNPCML-CHENLIRQTNTHIRSTGKCE-----	
1uvg	-----DSEMCKDYRVL-----PRIGYLCPKDLKPVCGDDGDTYNNPCML-CHENLIRQTNTHIRSTGKCEESTPGTTAASMPSPDE	
1ldt	-----KKVCN-----CPKILKPVCGSDGRTYANSCIARCN-----VSIKSE--GSCP-----TGILN---	
1hpt	---DSLGREAKCYNEL-----NG--CTEYRYPVCGTDGDTYNNPCML-CHENLIRQTNTHIRSTGKCEESTPGTTAASMPSPDE	
1tgs	---TSPQREACTCTSEV-----SG--CPKIYNPVCGTDGDTYNNPCML-CHENLIRQTNTHIRSTGKCEESTPGTTAASMPSPDE	
1pce	---EKQVFSRMPICEHMT-----ESPDCSRIDYDPVCGTDGDTYNNPCML-CHENLIRQTNTHIRSTGKCEESTPGTTAASMPSPDE	
1kma	-----FQGNPCE-----CPRALHRVCGSDGRTYNNPCML-CHENLIRQTNTHIRSTGKCEESTPGTTAASMPSPDE	
1ovo	---LAAVSVDCSEY-----PKP--ACPKDYRYPVCGSDNKTYSNKCNE-CAVAVESNGTTLTLSHFHGKC-----	
1omt	---LAAVSVDCSEY-----PKP--ACTLEYRYPVCGSDNKTYSNKCNE-CAVAVESNGTTLTLSHFHGKC-----	
1r0t	-----VPMDCSRYPNTTSEEGKVMTLCKKALNPVCGTDGDTYNNPCML-CHENLIRQTNTHIRSTGKCEESTPGTTAASMPSPDE	
2bus	-----XGAQVDCAEFKD-----PKV--YCTRESNPVCGSDNKTYSNKCNE-CAVAVESNGTTLTLSHFHGKC-----	
1iy6	-----AVSVDCSEY-----PKC--ACTMEYRYPVCGSDNKTYSNKCNE-CAVAVESNGTTLTLSHFHGKC-----	
1r0r	-----VDCSEY-----PKP--ACTLEYRYPVCGSDNKTYSNKCNE-CAVAVESNGTTLTLSHFHGKC-----	

Abb. 5.1: Vergleich der Aminosäuresequenzen und Bereiche mit regulären Sekundärstrukturelementen der 15. LEKTI-Domäne und einer Auswahl von Kazalvertretern

Mit ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) erstellter, veränderter Sequenzvergleich; Bereiche mit helikalen (rot) und β -Faltblatt-Strukturelementen (grün) wie in der PDBsum-Datenbank (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/pdbsum>; Laskowski, 2001; Laskowski *et al.*, 1997; Luscombe *et al.*, 1998) hinterlegt; 1uvf: COOH-terminal verkürzte LEKTI-Domäne 15 (GPdom15kurz); 1uvg: LEKTI-Domäne 15 (GPdom15); 1ldt: LDTI im Komplex mit Trypsin (*Hirudo medicinalis*; Stubbs *et al.*, 1997); 1hpt: Trypsin-Inhibitor aus Bauchspeicheldrüse vom Mensch (*Homo sapiens*; Hecht *et al.*, 1991, 1992); 1tgs: PSTI im Komplex mit Trypsin (*Sus scrofa*; Bolognesi *et al.*, 1982); 1pce: PEC-60 (*Sus scrofa*; Liepinsh *et al.*, 1994); 1kma: Dipetalin (*Dipetalogaster maximus*; Schlott *et al.*, 2002); 1ovo: 3. Domäne des Ovomucoid-Inhibitors aus Japanwachtel (*Coturnix coturnix japonica*; Papamokos *et al.*, 1982); 1r0t: 2. Domäne des Ovomucoid-Inhibitors aus Truthuhn (*Meleagris gallopavo*) im Komplex mit Trypsin (Ibrahim & Patabhi, 2004); 2bus: BUSI (Williamson *et al.*, 1985); 1iy6: P14C/N39C-Mutante von OMSVP3 (Hemmi *et al.*, 2002); 1r0r: OMTKY3 im Komplex mit Subtilisin (Horn *et al.*, 2003).

Auch hinsichtlich der Abschnitte, die das kurze dreisträngige, antiparallele β -Faltblatt bilden, entspricht die LEKTI-Domäne 15 den meisten anderen Inhibitoren vom Kazaltyp. So folgt der erste, der mittlere Strang (hier Val25 bis Gly27) direkt im Anschluss an die inhibitorische Bindungsschleife (hier Cys18 bis Lys23) und bildet mit dem zweiten (hier Gln31 bis Tyr33) haarnadelförmig verbundenen Strang ein sogenanntes β -*hairpin* Motiv aus. Der in einigen Fällen zusätzliche Abschnitt mit β -Faltblattstruktur im Bereich der P3-Position (Abb. 5.1) ist durch die Wechselwirkung mit der Proteinase bedingt, die bei Komplexbildung mit dem Inhibitor die Ausbildung eines Faltblattes üblicherweise der Reste P3 bis P1 des Inhibitors sowie der Reste 215 bis 216 im Fall von Trypsin induziert (Krowarsch *et al.*, 2003; Bode & Huber 1992).

Die relative Positionierung bzw. Orientierung von Helix und Faltblatt zueinander und damit auch die Geometrie der inhibitorischen Schleife erfolgt über den hydrophoben Kern (Bode & Huber, 1992; Laskowski & Qasim, 2000), an dessen Ausbildung das hoch konservierte Tyrosin in P13'-Position (hier Tyr33) beteiligt ist. Bei GPdom15kurz bzw. GPdom15 weist es daher zusammen mit Leu39 und Val25 die meisten NOE-Kontakte auf (Abb. 4.31) und ist für die Hochfeldverschiebung der γ - bzw. δ -Methylprotonen von Val25 und Leu39 verantwortlich (Abb. 4.15; Kap. 4.6.8). Ebenso wie bei nahezu allen anderen Kazalvertretern findet sich auch bei der LEKTI-Domäne 15 ein Glycin (Gly56) zwei Positionen vor dem sechsten Cystein (Abb. 5.1). Aufgrund seiner *turn*-artigen Konformation bringt es das sechste Cystein in eine für die Ausbildung der Disulfidbrücke, die den dritten (hier Ile52 bis Thr55) an den mittleren Faltblattstrang fixiert, günstige Orientierung. Dadurch trägt es entscheidend zur Gesamtstabilität der Proteinstruktur bei, wie bei Mutationsstudien mit Ovomucoid-Vertretern festgestellt wurde (Wang *et al.*, 2003). Bei GPdom15 setzt sich diese gewundene Konformation als kurze helikale Strukturierung der Reste Cys58 bis Ser61 fort (Abb. 4.34). Daher ergibt ein Vergleich der berechneten dreidimensionalen Strukturen der 15. LEKTI-Domäne mittels DALI-Server (*distance matrix alignment*, <http://www.ebi.ac.uk/dali/>; Holm & Sander 1993, 1996) bzw. dem Programm SSM (*secondary structure matching*; <http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/ssm>; Krissinel & Henrick, 2003) mit den in der Proteindatenbank hinterlegten Strukturen eine geringfügig unterschiedliche Rangfolge der Treffer. Die hohe Übereinstimmung mit strukturell bekannten Kazalvertretern bestätigt sich aber erneut.

So werden für GPdom15 Rhodniin (PDB: 1tbr; van de Locht *et al.*, 1995) und PSTI (PDB: 1tgs; Klaus & Schomburg, 1993) als die besten Treffer vom DALI-Server ermittelt, und von

SSM wird der höchste Wert für die Qualitätsfunktion, die sich aus einem möglichst niedrigen RMSD-Wert der C α -Atome und einer maximal möglichen Alignment-Länge zusammensetzt, für die P14C/N39C-Mutante von OMTSVP3 (PDB: 1iy6; Hemmi *et al.*, 2003) berechnet. Für GPdom15kurz weist nach DALI der PSTI (PDB: 1tgs; Klaus & Schomburg, 1993) und nach SSM der Inhibitor OMTKY3 (PDB: 1r0r, Horn *et al.*, 2003) die größte Ähnlichkeit auf, wie in Abb. 5.2 a und c stellvertretend gezeigt. Eine ähnliche hohe strukturelle Übereinstimmung wird für den LDTI (PDB: 1an1; Di Marco & Priestle, 1997) bzw. die zweite Domäne des Ovomucoid-Inhibitors aus Truthuhn (*Meleagris gallopavo*; PDB: 1r0t; Ibrahim & Pattabhi, 2004) OMTKY2 (= *ovomucoid domain 2 of turkey*) erhalten (Abb. 5.2 b, d).

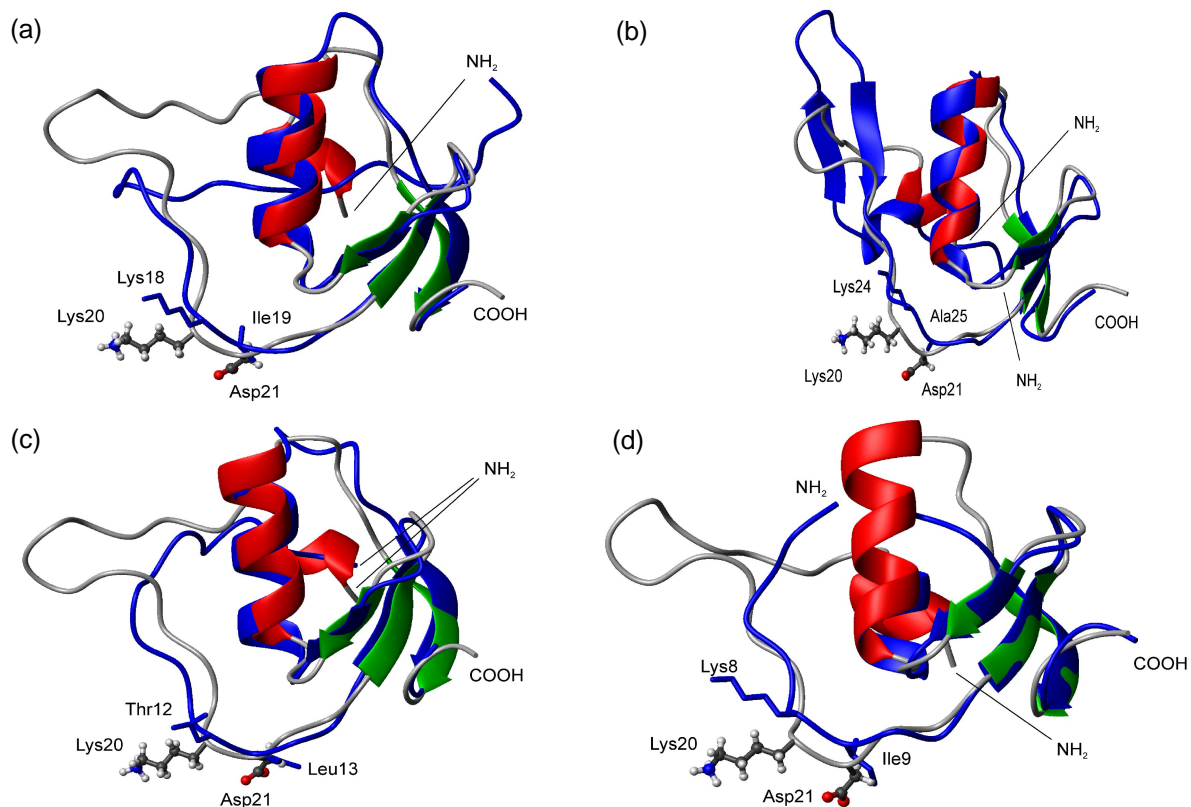


Abb. 5.2: Überlagerung der Struktur von GPdom15kurz mit den Strukturen (jeweils in blau) von (a) PSTI, (b) OMTKY2, (c) OMTKY3 (c) und (d) LDTI

Die Überlagerung der energieärmsten berechneten Struktur von GPdom15kurz ohne aminoterminal Gly-Pro-Sequenz erfolgte mit Hilfe des Programms SSM (<http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/ssm>; Krissinel & Henrick, 2003) und den in der Proteindatenbank (<http://www.rcsb.org/pdb>; Berman *et al.*, 2000) hinterlegten Strukturen von (a) PSTI (PDB: 1tgs; Bolognesi *et al.*, 1982), (b) OMTKY2 (PDB: 1r0t; Ibrahim & Pattabhi, 2004), (c) OMTKY3 (PDB: 1r0r; Horn *et al.*, 2003) und (d) LDTI (PDB: 1an1; Di Marco & Priestle, 1997); Verlauf des Proteinrückgrats und der Abschnitte mit regulären Sekundärstrukturelementen von GPdom15kurz und der überlagerten Struktur sind schematisch dargestellt; helikale Bereiche sind rot und Faltblattsräume grün bzw. die Vergleichsstruktur blau eingefärbt; Seitenketten der Reste in P1- (Lys20) und P1'-Position (Asp21) sind für GPdom15kurz als Kugel-Stabmodell bzw. für die jeweilige Vergleichsstruktur als Stäbchen-Modell ohne Wasserstoffatome wiedergegeben; Termini sind mit NH₂ und COOH bezeichnet.

Die Proline der LEKTI-Domäne 15 liegen in *trans*-Konformation vor

Für GPdom15 und GPdom15kurz wurden in den NMR-Spektren ausschließlich die für die *trans*-Konformation der Proline charakteristischen $\text{HN}_{(\text{Pro-1})}\text{H}\delta_{(\text{Pro})}$ - und $\text{H}\alpha_{(\text{Pro-1})}\text{H}\delta_{(\text{Pro})}$ -NOE-Kreuzsignale beobachtet (Kap. 4.6.4; Wüthrich, 1986), während einige strukturell bekannte Kazalvertreter, wie der BUSI (Williamson *et al.*, 1985) und alle natürlichen Vertreter der dritten Domäne des Ovomuroid-Inhibitors (z.B. PDB: 1tur; Krezel *et al.*, 1994; Robertson *et al.*, 1988), in P7-Position ein *cis*-Prolin aufweisen (Abb. 5.1). Für die Ovomuroid-Inhibitoren wird in der Literatur die Möglichkeit diskutiert, dass ein Tyrosin in unmittelbarer Nachbarschaft zu dem Prolin in P7-Stellung (Abb. 5.1) aufgrund der dann möglichen Wechselwirkungen die Ursache für die *cis*-Konformation des Prolins sein könnte (Song *et al.*, 2003). Zwar findet sich ein entsprechendes Prolin bei der LEKTI-Domäne 15 in ähnlicher Position (P9), jedoch liegt weder in der Sequenz noch in der Struktur eine aromatische Aminosäure in direkter Umgebung eines Prolins. Zudem erlauben die gegenüber den klassischen Kazalvertretern zusätzlichen sechs Aminosäuren zwischen den ersten beiden Cysteinen (Abb. 5.1; Greene & Bartlet, 1969; Laskowski & Kato, 1980; Mägert, *et al.*, 1999) bei der 15. LEKTI-Domäne, wie bei OMTKY2 (Ibrahim & Pattabhi, 2004), eine entspannte Anordnung dieser Reste (Abb. 5.1, 5.2 b).

Durch Einbeziehung von zwei dieser 12 Aminosäuren in die Ausbildung der kurzen aminoterminalen Helix (Ser2-Asp7; Abb. 5.1) wird in Verbindung mit dem Turn, der von den Resten Pro12 bis Ile14 gebildet wird, der übliche Abstand zwischen den ersten beiden Cysteinen eingehalten und so der Kazal-Grundfaltungstyp bei der LEKTI-Domäne 15 nicht beeinträchtigt. Auf ähnliche Weise sind die 16 Reste zwischen den ersten beiden Cysteinen bei der erst vor kurzem beschriebenen Kristallstruktur von OMTKY2 (PDB. 1r0t; Ibrahim & Pattabhi, 2004) angeordnet (Abb. 5.1), von denen ebenfalls zwei an einer kurzen Helix (Cys5-Arg7) beteiligt sind (Abb. 5.2 b). Die gegenüber der 15. LEKTI-Domäne weiteren vier Aminosäuren in diesem Bereich erlauben die bei GPdom15 bzw. GPdom15kurz nur angedeutete Ausbildung eines kurzen antiparallelen β -Faltblattes in Form eines β -*hairpin*-Motivs (Abb. 5.1, 5.2 b).

Bei der 15. LEKTI-Domäne sind die Reste zwischen den ersten beiden Cysteinen V-förmig angeordnet und bilden einen kleinen weiteren hydrophoben Kern aus, der vor allem durch Val10 und die beiden aromatischen Seitenketten von Tyr8 und Tyr16, die in den meisten der akzeptierten Strukturen parallel aufeinander packen (Abb. 5.5), gebildet wird. Stabilisierende Kontakte dieses Abschnittes zum übrigen Protein wurden im Gegensatz zur 1. bzw. 6. LEKTI-Domäne (Lauber *et al.*, 2003) hier nicht gefunden.

Vergleich von LEKTI-Domäne 15 mit den LEKTI-Domänen 1,6 und 1PI

Die 13 Reste zwischen den ersten beiden Cysteinen (Abb. 5.3) sind bei den LEKTI-Domänen 1 und 6 (PDB: 1hdl und 1h0z; Lauber *et al.*, 2003) ebenfalls V-förmig angeordnet. Auch findet sich eine helikale Strukturierung im Bereich des ersten Cysteins bzw. bei Domäne 1 zusätzlich ein kurzes Faltblatt (Abb. 5.3, 5.4), so dass sich der Abstand zwischen den Cysteinen reduziert und diesen eine Kazal-artige Orientierung erlaubt (Lauber *et al.*, 2003). Bei beiden Domänen, die jeweils zwei Disulfidbrücken mit einem Domäne 15 analogen Verbrückungsmuster besitzen (Abb. 1.2), wird dieser Abschnitt und dessen Position vor allem über Wechselwirkungen hydrophober Seitenketten von Resten innerhalb der *turn*- bzw. Faltblatt-Region und mit Resten der zentralen Helix stabilisiert (Lauber *et al.*, 2003).

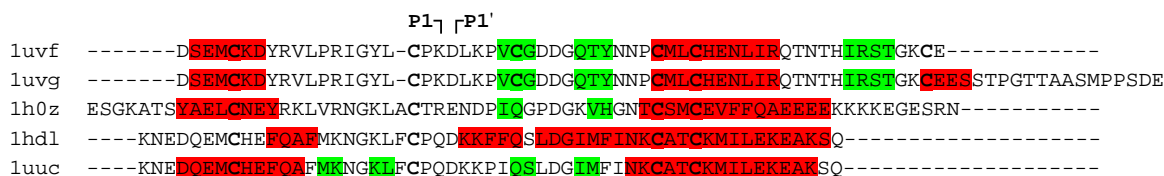


Abb. 5.3: Vergleich der Aminosäuresequenzen und Bereiche mit regulären Sekundärstrukturelementen der strukturell bekannten LEKTI-Domänen

Bereiche mit helikalen (rot) und β -Faltblatt-Strukturelementen (grün) wie mit PROMOTIF (Hutchinson & Thornton, 1996) ermittelt, bzw. in der Literatur angegeben und anhand des Cysteinmusters bzw. der P1-P1'-Position angeordnet; 1uvf: COOH-terminal verkürzte LEKTI-Domäne 15 (GPdom15kurz); 1uvg: LEKTI-Domäne 15 (GPdom15); 1h0z: LEKTI-Domäne 6 (Lauber *et al.*, 2003); 1hdl: LEKTI-Domäne 1 (Lauber *et al.*, 2003); 1uuc: F28P/F29I-Mutante der LEKTI-Domäne 1 (Tidow *et al.*, 2004).

Domäne 6 weist einen Kazal-ähnlichen Faltungstyp auf, dem bezüglich Domäne 15 der dritte Faltblattstrang und die dritte Disulfidbrücke fehlt (Abb. 5.4 b). Die daher gegenüber der Domäne 15 deutlich weniger rigide Bindungsschleife könnte ein Grund dafür sein, dass die Domäne 6 einen nur temporären Inhibitor gegenüber Trypsin darstellt (Tab. 5.1; vgl. Kap. 5.5; Krowarsch *et al.*, 2003; Lauber *et al.*, 2003).

Die Domäne 1 zeigt gegenüber Domäne 15 größere strukturelle Unterschiede (Abb. 5.4 a) und weist im Bereich der „Bindungsschleife“ eine helikale Strukturierung auf, die für das Fehlen der inhibitorischen Wirkung von Domäne 1 verantwortlich gemacht wird (Lauber *et al.*, 2003). Durch Substitution der Reste Phe28 und Phe29 durch Prolin und Isoleucin wird die Bindungsschleife von Domäne 1 in eine annähernd kanonische Konformation gebracht und die Ausbildung eines Kazal-homologen Faltblattes induziert (Abb. 5.4 c; Tidow *et al.*, 2004). Die nur schwach ausgeprägte Hemmwirkung dieser F28P/F29I-Mutante von Domäne 1 gegenüber Chymotrypsin und PMN-Elastase geht mit einer erhöhten Flexibilität (ps-ns-Zeitska-

la) sowie mit einer größeren Unbestimmtheit der Φ - und Ψ -Winkel für den Bereich der inhibitorischen Schleife einher (Tab. 5.1; Tidow *et al.*, 2004) und lässt auf eine nur geringe Stabilisierung dieses Abschnittes schließen (Krowarsch *et al.*, 2003). Die Bindungsschleife dieser Mutante ist gegenüber der von GPdom15kurz bzw. GPdom15 deutlich in Richtung aminoterminale Helix verdreht, so dass in der vorliegenden Überlagerung (Abb. 5.4 c) ein Abstand zwischen den C α -Atomen der jeweiligen P1-Reste von mehr als 11 Å resultiert.

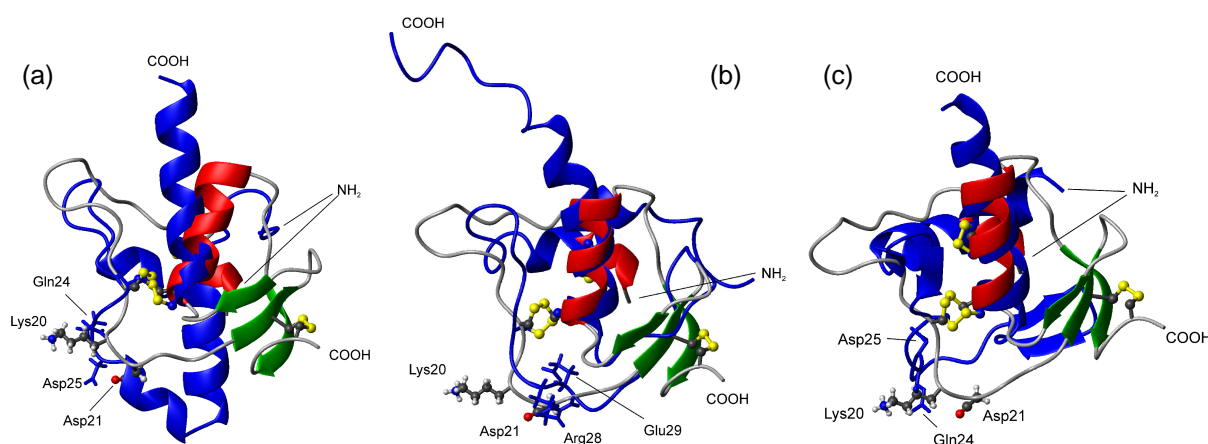


Abb. 5.4: Überlagerung einer akzeptierten Struktur von GPdom15kurz mit einer Struktur (jeweils in blau) der LEKTI-Domäne 1 (a), 6 (b) und der F28P/F29I-Mutante von LEKTI-Domäne 1 (c)

Die Überlagerung der energieärmsten berechneten Struktur von GPdom15kurz ohne aminoterminale Gly-Pro-Sequenz erfolgte mit Hilfe des Programms MOLMOL (Version 2K.1; Koradi *et al.*, 1996) mit den C α -Atomen homologer Cysteine als Bezugspunkt und jeweils der ersten Struktur der in der Proteindatenbank (<http://www.rcsb.org/pdb>; Berman *et al.*, 2000) hinterlegten Strukturschar der (a) LEKTI-Domäne 1 (PDB: 1hdl; Lauber *et al.*, 2003), (b) 6 (PDB: 1h0z; Lauber *et al.*, 2003) und (c) der F28P/F29I-Mutante von LEKTI-Domäne 1 (PDB: 1uuc; Tidow *et al.*, 2004); Verlauf des Proteinrückgrates und der Abschnitte mit regulären Sekundärelementen von GPdom15kurz und der überlagerten Struktur sind schematisch dargestellt; helikale Bereiche sind rot und Faltblattschichten grün bzw. die Vergleichsstruktur blau eingefärbt; Seitenketten der Reste in P1 (Lys20) und P1'-Position (Asp21) sind für GPdom15kurz als Kugel-Stabmodell bzw. für die jeweilige Vergleichsstruktur als Stäbchen-Modell ohne Wasserstoffatome unter Angabe von Sequenzposition und Aminosäureart wiedergegeben; Termini sind mit NH₂ und COOH bezeichnet.

Die LEKTI-Domäne 15 weist eine starre inhibitorische Schleife auf

Die LEKTI-Domäne 15 weist wie nahezu alle anderen typischen Kazalvertreter (nach MEROPS-Datenbank; <http://merops.sanger.ac.uk>; Rawlings *et al.*, 2004 a, b) ein Asparagin zwei Positionen vor dem dritten Cystein auf (Abb. 5.1), das üblicherweise eine Wasserstoffbrückenbindung über die δ -Protonen zu den Carbonylsauerstoffatomen (Proteinrückgrat) der Reste in P2- und P1'-Position ausbildet und damit die Konformation der inhibitorischen Schleife zusätzlich stabilisiert (Abb. 1.1; Krowarsch *et al.*, 2003). Für die LEKTI-Domäne 15 kann eine entsprechende Wechselwirkung für die δ -Protonen von Asn35 insbesondere zu

Asp21.O (P1') als gegeben angenommen werden, da bei GPdom15 bzw. GPdom15kurz die Distanzvorgaben zur Ableitung einer Wasserstoffbrückenbindung von 2,30 Å (Kap. 4.6.3.2) mit 2,38 Å nur sehr knapp nicht erfüllt werden und zudem die Resonanzsignale für die δ -Protonen von Asn35 während des H/D-Austauschexperiments bis ca. 45 min nach Lösen der Probe zu beobachten waren (Kap. 4.6.3.2). Für Pro19 (P2) hingegen liegt der entsprechende Abstand mit 2,65 Å deutlich über dieser Distanzvorgabe (Kap. 4.6.3.2).

Tab. 5.1: Vergleich der Rückgrat-Torsionswinkel Ψ und Φ der inhibitorischen Schleife (P3-P3') von Dipetalin und der LEKTI-Domänen

PDB		P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'
kano-nisch	Φ	-140 - -120	-100 - -60	-120 - -95	-100 - -60	-140 - -100	-140 - -100
	Ψ	140 - 170	140 - 180	10 - 50	140 - 180	70 - 120	70 - 120
1kma		Cys8	Pro	Arg	Ala	Leu	His
	Φ	-106,5 \pm 41,3	-78,7 \pm 4,1	-79,8 \pm 4,1	-65,7 \pm 1,0	-81,8 \pm 3,9	-86,4 \pm 15,5
	Ψ	164,7 \pm 3,0	165,4 \pm 4,4	44,3 \pm 1,2	125,5 \pm 6,2	47,3 \pm 13,2	65,5 \pm 9,0
1uvf		Cys18	Pro	Lys	Asp	Leu	Lys
	Φ	-126,4 \pm 9,6	-71,8 \pm 1,0	-87,1 \pm 3,1	-65,4 \pm 8,4	-84,6 \pm 7,7	-125,0 \pm 7,5
	Ψ	156,4 \pm 0,8	168,0 \pm 2,8	-21,1 \pm 8,3	120,3 \pm 9,4	113,4 \pm 5,1	105,6 \pm 4,9
1uvg		Cys18	Pro	Lys	Asp	Leu	Lys
	Φ	-129,9 \pm 10,4	-71,4 \pm 1,0	-87,3 \pm 2,9	-65,7 \pm 7,1	-84,6 \pm 8,0	-123,9 \pm 7,5
	Ψ	156,6 \pm 1,0	168,0 \pm 2,9	-21,0 \pm 6,8	120,3 \pm 9,2	112,4 \pm 5,8	106,8 \pm 3,4
1hdl		Cys22	Pro	Gln	Asp	Lys	Lys
	Φ	-51,9 \pm 3,8	-62,8 \pm 1,6	-118,6 \pm 8,7	-135,0 \pm 43,7	-61,8 \pm 5,9	-41,7 \pm 0,9
	Ψ	46,5 \pm 2,5	79,9 \pm 4,5	-79,5 \pm 40,8	68,9 \pm 7,0	-8,7 \pm 5,1	-26,9 \pm 0,7
1uuc	Φ	-92,1 \pm 23,7	-61,2 \pm 3,1	-77,4 \pm 40,7	-78,0 \pm 58,2	-74,6 \pm 23,1	-95,8 \pm 42,6
	Ψ	93,8 \pm 24,6	173,7 \pm 60,8	-92,2 \pm 48,3	130,4 \pm 39,7	-24,8 \pm 76,6	120,8 \pm 27,6
1h0z		Cys26	Thr	Arg	Glu	Asn	Asp
	Φ	-136,9 \pm 26,7	-105,6 \pm 19,8	-84,5 \pm 16,3	-52,9 \pm 61,7	-110,7 \pm 21,5	-142,1 \pm 60,6
	Ψ	179,2 \pm 14,9	-176,5 \pm 8,4	21,2 \pm 38,9	150,3 \pm 13,9	59,2 \pm 6,6	78,8 \pm 7,9

Die mit MOLMOL (Version 2K.1; Koradi *et al.*, 1996) bzw. PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993, 1996) ermittelten Werte wurden grau unterlegt, wenn sie nicht im kanonischen Bereich (Bode & Huber, 1992) liegen; die Sequenzposition für Cystein in P3-Position ist angegeben; Abkürzungen der Strukturen entsprechend der Proteindatenbankkennung; 1kma: Dipetalin (20 Strukturen; Schlott *et al.*, 2002); 1uvf: COOH-terminal verkürzte LEKTI-Domäne 15 (GPdom15kurz; 31 Strukturen); 1uvg: LEKTI-Domäne 15 (GPdom15; 31 Strukturen); 1hdl: LEKTI-Domäne 1 (21 Strukturen; Lauber *et al.*, 2003); 1uuc: F28P/F29I-Mutante von LEKTI-Domäne 1 (30 Strukturen; Tidow *et al.*, 2004); 1h0z: LEKTI-Domäne 6 (21 Strukturen).

Anders als die meisten Kazalvertreter, die in P2-Position ein Threonin aufweisen, besitzt die LEKTI-Domäne 15 ebenso wie etwa 15 % der anderen Kazalinhhibitoren (Apostoluk & Otlewski, 1998; Laskowski, 2002) ein Prolin an dieser Position, das aufgrund seiner Ringstruktur und der dadurch eingeschränkten Konformationsfreiheit zusammen mit dem disulfidverbrückten Cystein in P3-Position die Rückgratgeometrie der inhibitorischen Schleife versteift

(Apostoluk & Otlewski, 1998). Dementsprechend variieren bei der LEKTI-Domäne 15 die Rückgrattorsionswinkel Φ und Ψ in diesem Bereich nur wenig (Tab. 5.1) und liegen zudem meist in den Wertebereichen, die von Bode und Huber (1992) als charakteristisch für kanonische Inhibitoren beschrieben wurden. Lediglich die Ψ -Winkel von Lys20 (P1) und Leu22 (P2') weichen hier um mehr als 20° Grad ab. Somit kann die hohe Stabilität der LEKTI-Domäne 15 gegenüber Trypsin (Kap. 5.5) mit der gut stabilisierten Rückgratkonformation der inhibitorischen Schleife zusammen mit der sehr rigiden Tertiärstruktur erklärt werden. Die niedrigen K_i -Werte deuten ferner auf einen stabilen Proteinase-Inhibitor-Komplex hin (Kap. 4.5.2, 5.5), so dass allgemein ein Ablösen des Inhibitors selbst im Falle einer Spaltung der P1-P1'-Bindung nicht begünstigt ist (Apostoluk & Otlewski, 1998; Laskowski & Qasim, 2000) und auch eine Resynthese der Peptidbindung ermöglichen würde (Ardelt *et al.*, 1985; Marx *et al.*, 2003). Sehr ähnliche, ebenfalls nur wenig variierende Werte für die Winkel der Bindungsschleife wie GPdom15 bzw. GPdom15kurz weist Dipetalin auf (Tab. 5.1; Schlott *et al.*, 2002). Dipetalin ist der einzige weitere mittels NMR-Spektroskopie strukturell aufgeklärte Kazalvertreter mit Cys-Pro-Abfolge in P3-P2-Position und zeigt gegenüber Trypsin ebenfalls eine starke Hemmung mit einem K_i -Wert, der wie für GPdom15kurz bzw. GPdom15 im einstelligen nM-Bereich liegt (Kap. 4.5.2, 5.5; Schlott *et al.*, 2002). Außer für den Amino- und Carboxyterminus ist bei Dipetalin auch für die Reste in P1 (Cys8), P1' (Ala11) und P2'-Position (Leu12; Abb. 5.1) sowie für den *turn* des *hairpin*-Motivs zwischen erstem und zweitem Faltblatt eine erhöhte Beweglichkeit (ps-ns-Zeitskala) gefunden worden (Schlott *et al.*, 2002). Bei GPdom15 und GPdom15kurz scheint die inhibitorische Schleife noch rigider als bei Dipetalin zu sein, da hier neben Arg13 und Ile14 und den Termini nur Asp21 und Leu22 in P1'- und P2'-Position eine weniger stark eingeschränkte interne Mobilität der N-H-Vektoren (Abb. 4.28; Kay *et al.*, 1989), aufweisen (Kap. 4.6.6) und dementsprechend auch eine geringere NOE-Anzahl gefunden wurde (Abb. 4.31).

5.5 Untersuchungen zur biologischen Funktion der LEKTI-Domäne 15-Varianten

Der COOH-Terminus scheint keinen Einfluss auf die Proteinase-Inhibierung zu haben

Zwar sind die natürlichen Prozessierungsstellen des LEKTI-Vorläuferproteins noch nicht bekannt, dennoch gibt es erste konkrete Hinweise auf eine mögliche Spaltung durch in der Haut vorkommende Proteinasen (Kap. 1.4; Komatsu *et al.*, 2002; Mitsudo *et al.*, 2003). Der 18 Aminosäuren lange COOH-terminale Abschnitt nach dem letzten Cystein weist bei der LEKTI-Domäne 15 jedoch kein solches potentiell SPC-Schnittstellenmotiv auf, so dass eine Funktion beispielsweise bei der Inhibierung von Proteinasen nicht ausgeschlossen werden kann (Abb. 1.2; Kap. 1.4). Die Überprüfung des carboxyterminalen Sequenzbereiches auf eine Ähnlichkeit zu bereits bekannten Motiven mit Hilfe des ProfileScan Servers (<http://hits.isb-sib.ch/cgi-bin/PFSCAN>; Falquet *et al.*, 2002) bzw. mittels ScanProsite (<http://www.expasy.org/tools/scanprosite/>; Gattiker *et al.*, 2002 b; Hulo *et al.*, 2004) ergab jedoch keine Hinweise auf eine mögliche Funktion, wie sie beispielsweise für die entsprechenden Sequenzabschnitte von Hirudin (Grütter *et al.*, 1990; Rydel *et al.*, 1990, 1991; Stubbs & Bode, 1995) oder des nicht-klassischen Kazalvertreter Bdelin aus koreanischem Blutegel beobachtet wird (*Hirudo nipponia*; Fink *et al.*, 1986; Kim *et al.*, 1996, 2001). Bei Hirudin bzw. Bdelin umfasst dieser Bereich jeweils 17 Aminosäuren und ist mit zahlreichen sauren Resten versehen, die zur Verankerung auf der Thrombinoberfläche (Grütter *et al.*, 1990; Rydel *et al.*, 1990, 1991; Stubbs & Bode, 1995) bzw. zur Bindung positiv geladener Ionen dienen (Fink *et al.*, 1986; Kim *et al.*, 1996, 2001).

Für die carboxyterminalen Bereiche anderer strukturell bekannter Kazalvertreter, wie beispielsweise für den sechs bzw. sieben Reste langen unstrukturierten COOH-Terminus von LDTI (Di Marco & Priestle, 1997; Stubbs *et al.*, 1997) und Dipetalin (Schlott *et al.*, 2002), finden sich in der Literatur keine Hinweise auf eine Funktion. Lediglich bei Rhodniin (Friedrich *et al.*, 1993; van de Locht *et al.*, 1995) fungiert der acht Aminosäuren lange Bereich nach dem letzten Cystein ebenso wie die sechs Reste umfassende Sequenz bei Osteonectin (Hohenester *et al.*, 1997; Innis & Hyvonen, 2003; Sasaki *et al.*, 1998) als Linker zwischen zwei Domänen.

Zusammen mit einem identischen Verhalten von GPdom15kurz und GPdom15 gegenüber den bisher getesteten Proteinasen (Kap. 4.5.2) ist damit eine Funktion der 18 COOH-terminalen Reste bei der Inhibierung wenig wahrscheinlich, auch wenn bislang weder die natürlich pro-

zessierte Form der LEKTI-Domäne 15 noch deren eigentliche Zielproteinase gefunden wurde.

β-Tryptase wird von der LEKTI-Domäne 15 nicht inhibiert

Die aufgrund der großen Sequenzhomologie zwischen LDTI, dem einzig bislang natürlich vorkommenden Tryptase-Inhibitor (Sommerhoff *et al.*, 1994), und der LEKTI-Domäne 15 (Abb. 4.13) vermutete inhibitorische Wirkung gegenüber β-Tryptase (Sommerhoff *et al.*, 2000) hat sich im Rahmen der Analyse der inhibitorischen Wirkung von GPdom15 und GPdom15kurz nicht bestätigt (Kap. 4.5.2). Dies kann auf die größeren Ausmaße der LEKTI-Domäne 15 gegenüber dem LDTI (ca. $14 \times 20 \times 28$ Å; Ab. 5.2 d) zurückgeführt werden, da für GPdom15kurz eine Größe von etwa $22 \times 30 \times 40$ Å festgestellt wird, während die beiden Poren des ringförmigen β-Tryptase-Tetramers eine Öffnung von etwa 40×15 Å Größe aufweisen (Pereira *et al.*, 1998). Dadurch bleibt der Zugang zu den katalytischen Zentren der Monomere, die jeweils in die Mitte des vom Tetramer gebildeten zentralen Hohlraums orientiert sind, für GPdom15kurz bzw. GPdom15 verwehrt (vgl. Sommerhoff *et al.*, 2000). Zwar war von einigen anderen klassischen Kazalvertretern wie PSTI (Klaus & Schomburg, 1993) oder der dritten Domäne des Ovomuroid-Inhibitors aus Japanwachtel (Papamokos *et al.*, 1982) bereits bekannt, dass diese aus sterischen Gründen β-Tryptase nicht hemmen können (Sommerhoff *et al.*, 2000). Aufgrund des ungewöhnlichen Cysteinmusters von LEKTI wurden jedoch kleinere Strukturen für diese möglicherweise atypischen Kazal-ähnlichen Domänen vermutet, und daher eine inhibitorische Wirkung gegenüber Tryptase erwartet (Sommerhoff *et al.*, 2000). Während für LEKTI-Domäne 15 trotz der zusätzlichen Reste zwischen den ersten beiden Cysteinen eine typische Kazalstruktur resultiert, weist Domäne 6 gegenüber Domäne 15 eine etwas weniger breite Struktur von nur ca. $10 \times 20 \times 50$ Å auf (Abb. 5.4 b). Trotzdem wurde auch für Domäne 6 keine Inhibierung von β-Tryptase festgestellt (Mägert *et al.*, 1999). Auch die an die LDTI-Sequenz angepasste LEKTI-Domäne 15-Variante GPdom15ldti zeigt keine inhibierende Wirkung gegenüber β-Tryptase (Kap. 4.5.2; 4.7.2).

Nachdem eine Fehlregulation der verstärkenden Wirkung von Tryptase auf die Immunantwort (Kap. 1.4; He *et al.*, 1997, 1998; Schechter *et al.*, 1998) sowie ihrer mediatorischen Eigenschaft gegenüber Asthma (Rice *et al.*, 1998) einen sehr plausiblen Zusammenhang mit den beim Netherton Syndrom beobachteten Symptomen (Atopie, Hypereosinophilie, hohe IgE-Konzentrationen, Prädisposition von Asthma; Mägert *et al.*, 1999) bietet und mit den bisherigen Erkenntnissen über die inhibitorischen Eigenschaften der verschiedenen LEKTI-Fragmente in Einklang steht (Komatsu *et al.*, 2002; Mägert *et al.*, 1999, 2002 a, b; Mitsudo *et al.*,

2003), lässt vermuten, dass eine der anderen bislang strukturell noch unbekannten 13 Domänen eine entsprechend kleine bzw. schlanke Molekülform aufweist, die eine Tryptase-Inhibierung ermöglicht. Nachdem Domäne 14 ebenso wie Domäne 15 bei allen bislang genetisch untersuchten Patienten mit Netherton Syndrom nicht gebildet wird (Bitoun *et al.*, 2002) und anders als die meisten anderen LEKTI-Domänen ebenfalls ein Prolin in P2-Position aufweist, das einen entscheidenden Beitrag zur Stabilität der inhibitorischen Schleife liefert (Kap. 5.4; Apostoluk & Otlewski, 1998), wäre auch im Hinblick auf die potentiellen Schnittstellen für SPCs (Abb. 1.2; Komatsu *et al.*, 2002) und den daraus resultierenden Sequenzbereich eine Charakterisierung der Domäne 14 von großem Interesse.

Die LEKTI-Domäne 15 reduziert die Infektionsrate von HI-Viren nicht

Nachdem LDTI gegenüber der menschlichen β -Tryptase als starker Inhibitor wirkt, wird angenommen, dass die für LDTI beobachtete Inhibierung der HIV-Infektion von HUT-78 Zellen auf der hemmenden Wirkung gegenüber der Serinproteinase Granzym K (Tryptase TL₂) beruht (Auerswald *et al.*, 1994). Diese ist auf der Oberfläche von T4⁺-Lymphozyten lokalisiert und interagiert mit dem HIV-Hüll-Protein gp120 sowie dem CD4-Rezeptor während der frühen Phase des Andockens und Eindringens des Virus in die Zelle (Hattori *et al.*, 1989; Inoue *et al.*, 1994; Katunuma & Kido 1990; Niwa *et al.*, 1996). Aufgrund der hohen Sequenzhomologie zu LDTI (Kap. 4.5.3) und der inhibitorischen Wirkung von GPdom15kurz bzw. GPdom15 gegenüber Trypsin (Kap. 4.5.2; s.u.) wurde für die LEKTI-Domäne 15 eine ähnliche Wirkung gegenüber Granzym K, das ein Trypsin-ähnliches Verhalten zeigt (Hink-Schauer *et al.*, 2002; Sattar *et al.*, 2003), und damit eine Hemmung der HIV-Infektion für möglich erachtet.

Eine hemmende Wirkung auf die HIV-Infektionsrate konnte für GPdom15 bzw. GPdom15kurz im Gegensatz zur verwendeten Kontrollsubstanz Lamivudin, einem Nukleosid-Analogon (Anderson, 2002), nicht festgestellt werden (Kap. 4.5.3).

Die LEKTI-Domäne 15 ist gegenüber Trypsin und Plasmin ein starker und kompetitiver Inhibitor

Die aus den Ergebnissen des Testsystems, das für eine erste Untersuchung der inhibitorischen Eigenschaft der LEKTI-Domäne 15-Varianten gegenüber Trypsin eingesetzt wurde (Kap. 4.5.1), gewonnenen Werte für die jeweils zu 50 % inhibitorisch wirkende Konzentration IC₅₀ unterscheiden sich für GPdom15 (IC₅₀ ca. 175 nM) und GPdom15kurz (IC₅₀ ca. 245 nM) nur gering (Kap. 4.5.1). Die daraus abgeleitete starke Inhibierung von Trypsin wird durch die

Werte für die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_i , die für GPdom15kurz und GPdom15 jeweils knapp 1 nM beträgt, bestätigt (Kap. 4.5.2).

Auch liegen die ermittelten IC_{50} -Werte in der gleichen Größenordnung wie von Mägert *et al.* (1999) für die LEKTI-Domäne 6 (ca. 150 nM bei 6,25 μ g/ml Trypsin) beschrieben. Im Gegensatz zu Domäne 6, deren inhibitorische Wirkung bereits nach 30 min merklich nachließ und nach 1 h nur noch 50 % betrug (Kreutzmann *et al.*, 2004), blieb die Hemmung der Trypsinaktivität durch GPdom15 bzw. GPdom15kurz für mehr als 100 min unverändert (Kap. 4.5.1). Die hohe Stabilität gegenüber Trypsin ist wahrscheinlich auf die relativ starre Konformation der Bindungsschleife und die insgesamt sehr stabile, durch drei Disulfidbrücken gestützte Tertiärstruktur zurückzuführen (Kap. 5.4; Lauber *et al.*, 2003). Diese Annahme steht mit der Beobachtung im Einklang, dass sich die inhibitorische Wirkung des alle 15 Domänen umfassenden *full-length*-LEKTI-Proteins durch DTT-Zugabe drastisch verringert (Mitsudo *et al.*, 2003). Eine weniger gut stabilisierte Rückgratkonformation der Bindungsschleife ist oftmals Ursache einer weniger stark ausgeprägten inhibitorischen Eigenschaft (Krowarsch *et al.*, 2003), wie sich auch im Fall der LEKTI-Domäne 6 bzw. der F28P/F29I-Mutante von Domäne 1 bestätigt und auch beispielsweise von PEC-60 (PDB: 1pce; Liepinsh *et al.*, 1994), einem 60 Reste großen Kazalvertreter aus dem Darm vom Schwein, bekannt ist. Eine Ableitung der stabilisierenden Wirkung der dritten Disulfidbrücke (Cys26-Cys58) wäre durch Charakterisierung einer entsprechenden Substitutionsmutante möglich. Während bereits eine Struktur eines Ovomuroid-Vertreterers bekannt ist, der eine zusätzlich eingeführte Disulfidbrücke aufweist (P14C/N39C-Mutante von OMTSVP3 (PDB: 1iy6; Hemmi *et al.*, 2003), ist bislang noch keine Kazalstruktur beschrieben worden, bei der eine Disulfidbrücke durch Mutation entfernt wurde.

Da die Domänen 6 (IC_{50} ca. 150 nM; Mägert *et al.*, 1999) und 15 (K_i ca. 0,8 nM; Kap. 4.5.2) einzeln eine deutlich stärkere Hemmung von Trypsin als das rekombinant hergestellte *full-length*-LEKTI-Protein zeigen (IC_{50} ca. 800 nM; K_i ca. 800 nM; Mitsudo *et al.*, 2003), sind diese Domänen in dem *full-length*-LEKTI-Protein für die Proteinase vermutlich nicht optimal zugänglich, da sonst eine ähnlich starke Hemmung wie für die einzelnen Domänen zu erwarten wäre. Die unterschiedlichen K_i -Werte der zusammenhängenden Domänen 6-9', die die Domänen 6-8 komplett und von der 9. Domäne die erste Hälfte umfassen (Glu356-Asn598; Jayakumar *et al.*, 2004), und von *full-length*-LEKTI gegenüber den jeweiligen Proteinasen unter annähernd gleichen Bedingungen lassen ferner vermuten, dass dieses 6-9'-Fragment im

full-length-LEKTI ebenfalls nicht bzw. nicht vollständig exponiert vorliegt. Die starke Plasminhemmung durch das *full-length*-Protein (K_i ca. 25 nM; Mitsudo *et al.*, 2003) bei gleichzeitig anscheinend weniger gut zugänglicher Domäne 15 legt nahe, dass noch weitere LEKTI-Domänen gegenüber Plasmin als Inhibitor wirken.

Die festgestellte starke Hemmung von Plasmin durch GPdom15 und GPdom15kurz bzw. durch das *full-length*-LEKTI könnte aufgrund der übereinstimmenden Präferenz von Trypsin und Plasmin hinsichtlich des Spaltstellenmotivs (nach BRENDA-Datenbank; <http://www.brenda.uni-koeln.de>; Schomburg *et al.*, 2000, 2004) eine Begleiterscheinung der Fähigkeit zur Trypsinhemmung sein. Plasmin könnte andererseits aber auch eine natürliche Zielproteinase von LEKTI darstellen, da Plasmin neben der eigentlichen Aufgabe, Fibrin in Blutgerinnseln aufzulösen, im Gewebe als proteolytischer Faktor auch bei einer Reihe von anderen Prozessen, wie beispielsweise Gewebeneubildung aber auch bei Immunreaktionen beteiligt ist (z.B. Syrovets & Simmet, 2004).

Im Gegensatz zur Domäne 6 (Mägert *et al.*, 1999), Domäne 15 (Kap. 4.5.2) oder dem LEKTI-Fragment 6-9' (Jayakumar *et al.*, 2004), verhält sich das *full-length*-LEKTI-Protein gegenüber Trypsin als nicht-kompetitiver Inhibitor (Mitsudo *et al.*, 2003). Dies legt den Schluss nahe, dass es bei *full-length*-LEKTI zu sekundären Wechselwirkungen zwischen Inhibitor und Proteinase kommen muss, oder dass die Inhibierung über solche Domänen erfolgt, die von sich aus nicht-kompetitiv sind. Letzteres kann zwar nicht ausgeschlossen werden, ist aber aufgrund der bisherigen Erkenntnisse über LEKTI, insbesondere dessen potentielle Prozessierungsstellen und der großen Sequenzhomologie der einzelnen Domänen untereinander wenig wahrscheinlich (Abb. 1.2).

Der aminoterminal Bereich von LEKTI-Domäne 15 ist für die Inhibierung mancher Proteinasen ein sterisches Hindernis

Das nach dem Standardprotokoll gewonnene GPdom15ldti (Kap. 4.3) zeigte keine inhibitorische Wirkung (Kap. 4.5.1, 4.7.2). Obgleich keine Aggregation festgestellt wurde, die oftmals ein Hinweis auf eine nicht korrekte Disulfidverbrückung ist (Mitraki & King, 1989), könnte dies auf falsch ausgebildete Disulfidverbrückung zurückzuführen sein (Kap. 4.7). Nach oxidativer Rückfaltung wurde für GPdom15ldti jedoch ein kompetitives Verhalten und eine sehr starke inhibitorische Wirkung gegenüber Trypsin (K_i ca. 1 nM) und Plasmin (K_i ca. 20 nM) beobachtet (Kap. 4.7.2), wie es auch für GPdom15 bzw. GPdom15kurz festgestellt wurde (Kap. 4.5.2), und lässt das Vorliegen einer Bindungsschleife mit kanonischer Geometrie vermuten (Kap. 4.7.2; Bode & Huber, 1992). Da sich GPdom15kurz und GPdom15ldti nur hin-

sichtlich des Bereichs zwischen den beiden ersten Cysteinen unterscheiden, konnte ein entsprechendes Strukturmodell für GPdom15ldti abgeleitet werden (Abb. 4.40; Kap. 4.7.2). Die Optimierung der Rückfaltungsbedingungen stellt einen möglichen Ansatzpunkt zur Gewinnung von für eine Strukturaufklärung ausreichenden Mengen an strukturiertem Protein dar (Kap. 4.7.2).

Neben der Inhibierung von Trypsin und Plasmin wurde für reoxidiertes GPdom15ldti im Gegensatz zu GPdom15kurz außerdem noch eine signifikante Hemmung von Chymotrypsin, sowie von PMN-Elastase und Subtilisin, die beide eine Chymotrypsin-ähnliche Präferenz hinsichtlich der Spaltstelle zeigen (nach BRENDA-Datenbank; <http://www.brenda.uni-koeln.de>; Schomburg *et al.*, 2000, 2004), beobachtet (Kap. 4.7.2). Nachdem der einzige Unterschied zwischen GPdom15ldti und GPdom15kurz in der Verkürzung des Bereichs zwischen den ersten beiden Cysteinen auf eine Aminosäure, ein Alanin, besteht (Kap. 4.7), sollte das unterschiedliche inhibitorische Verhalten von GPdom15ldti und GPdom15kurz hierauf zurückzuführen sein. Die Überlagerung der Strukturen von GPdom15kurz und GPdom15ldti bzw. LDTI verdeutlicht den großen Platzbedarf dieses Sequenzabschnittes (Abb. 5.2 d).

Zur Überprüfung, ob der Bereich zwischen den ersten beiden Cysteinen für die Inhibierung mancher Proteinase tatsächlich ein sterisches Hindernis darstellen kann, wurden die energieärmste der akzeptierten Strukturen von GPdom15kurz und die Modellstruktur von GPdom15ldti mit unterschiedlichen Proteinase-Komplexstrukturen verschiedener Kazalvertreter überlagert. Hierbei wurden als Bezugspunkt jeweils die C α -Atome der inhibitorischen Schleife gewählt, für die üblicherweise keine größeren Konformationsänderungen bei Komplexbildung mit der Proteinase beobachtet wird (Bode & Huber, 1992). Ebenso ist eine Konformationsänderung des ausreichend gut definierten Bereichs zwischen den ersten beiden Cysteinen bei GPdom15kurz aufgrund der stabilisierenden Wechselwirkungen der hydrophoben Seitenketten wenig wahrscheinlich.

Dabei bestätigte sich die Vermutung, dass für GPdom15kurz stets zahlreiche Überlappungen der Proteinrückgratatomene in dem Bereich zwischen den ersten beiden Cysteinen mit Atomen der Proteinase Elastase, Subtilisin und Chymotrypsin resultieren (Abb. 5.5), während diese bei Überlagerung mit GPdom15ldti nicht auftreten. Erwartungsgemäß zeigte sich dann weiter, dass für GPdom15kurz in den Trypsin- bzw. Plasmin-Komplexstrukturen keine dieser sterischen Konflikte auftreten. Dies steht mit der Beobachtung im Einklang, dass nicht nur die Kontakte der inhibitorischen Schleife für eine Inhibierung wichtig sind, sondern auch soge-

nannte sekundäre Kontaktregionen, die die Assoziationsenergie zur Proteinase ganz erheblich beeinflussen können (Buczek *et al.*, 2002; Laskowski & Qasim, 2000; Song & Markley (2001).

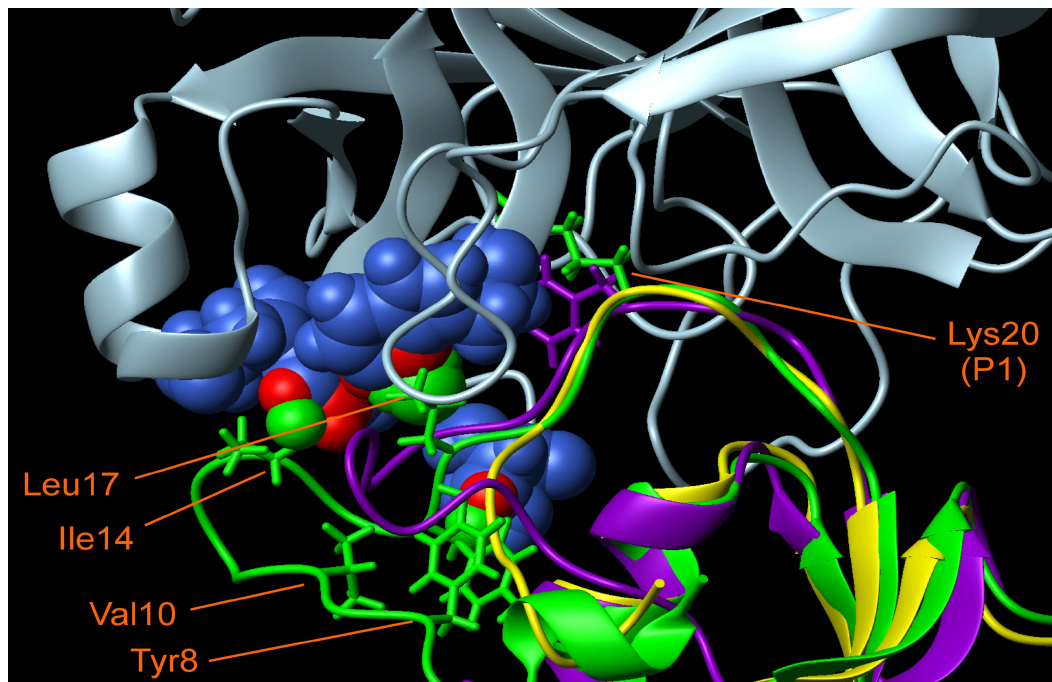


Abb. 5.5: Ausschnitt aus der Überlagerung der Kristallstruktur von Chymotrypsin (blaugrau) und PSTI (lila) mit einer Struktur von GPdom15kurz (grün) und der Modellstruktur für GPdom15ldti (gelb)

Die Überlagerung der in der Proteindatenbank (<http://www.rcsb.org/pdb>; Berman *et al.*, 2000) hinterlegten Kristallstruktur 1cgi (Hecht *et al.*, 1991) mit der energieärmsten akzeptierten Struktur von GPdom15kurz und der Modellstruktur für GPdom15ldti, wobei die α -Atome der Bindungsschleife als Bezugspunkt gewählt wurden, erfolgte mit Hilfe des Programms MOLMOL (Version 2K.1; Koradi *et al.*, 1996); Verlauf des Proteinerückgrates schematisch dargestellt; sterische Interaktionen mit einem Atomabstand kleiner 1,5 Å sind als Kalottenmodell in rot für Chymotrypsin und grün für GPdom15kurz wiedergegeben (Tyr16.HB-Ser218.HB: Ile14.1HG*/3HG*-Trp172.CZ3/3HZ/3HE; Trp215.HZ/CE3-Leu17.1HD*/CD/3HD*); Seitenketten von GPdom15kurz für Tyr8, Val10, Ile14, Tyr16, Leu17 und Lys20 als Stäbchenmodell.

Zwar stellt dies nur eine sehr einfache Art der Ableitung von möglichen sterischen Konflikten dar, die zudem die Rotationsmöglichkeit von Seitenketten oder die Induzierung der Faltblattstruktur für die P3-P1-Reste durch die Proteinase (Krowarsch *et al.*, 2003) nicht berücksichtigt. Trotzdem kann damit die fehlende inhibitorische Wirkung gegenüber Chymotrypsin auch für die LEKTI-Domäne 6 (Mägert *et al.*, 2002 b) sowie für OMTKY2, für die eine Hemmung von Trypsin mit K_i -Werten im einstelligen nM-Bereich, bislang aber keine Inhibierung von Chymotrypsin beschrieben wurde (Asao *et al.*, 1998, Ibrahim & Pattabhi, 2004), erklärt werden.

Kallikreine stellen möglicherweise eine natürliche Zielproteinase für die LEKTI-Domäne 15 dar

Die auch als *stratum corneum tryptic enzyme* (SCTE) bzw. *chymotryptic enzyme* (SCCE) bezeichneten Kallikreine hK5 und hK7 (Yousef & Diamandis, 2001) wurden im Zusammenhang mit dem Krankheitsbild Netherton Syndrom diskutiert (Komatsu *et al.*, 2002), da diese die Zell-Zell-Verbindungen (desmosomale Cadherine) auflösen und daher bei einer Fehlregulation durch eine nicht ausreichende Menge an Serinproteinase-Inhibitoren zu einer übermäßigen Hautschuppung führen (Abb. 1.3; Komatsu *et al.*, 2002). Bei Überprüfung einer möglichen inhibitorischen Wirkung von GPdom15kurz bzw. GPdom15 auf hK5 wurde *in vitro* keine Hemmung festgestellt (Kap. 4.5.2), wodurch SCTE als mögliche natürliche Zielproteinase der LEKTI-Domäne 15 als äußerst unwahrscheinlich einzustufen ist.

Nachdem SCCE und SCTE zwar das extrazelluläre Korneodesmosin aber nicht das Transmembranprotein Desmoglein-1 spalten (Simon *et al.*, 2001), dieses Cadherin aber im *stratum corneum* umgesetzt wird (Suzuki *et al.*, 1996), sind an der Proteolyse von Zell-Zell-Verbindungen vermutlich noch weitere Serinproteinasen beteiligt. Bei der Analyse der Expressionsrate der 15 verschiedenen Kallikreinvertreter (hK1-15) in normaler Haut stellten Komatsu *et al.* (2003) fest, dass die mRNA für hK1 und hK11 etwa im gleichen Umfang wie SPINK5-mRNA, aber in der etwa fünffachen Menge wie die mRNA für hK5 und hK7 vorliegt. Zusammen mit der bereits nachgewiesenen hohen Trypsin-artigen Hydrolyseaktivität im *stratum corneum* von an Netherton Syndrom erkrankten Patienten (Komatsu *et al.*, 2002) legt dies einen regulatorischen Zusammenhang zwischen dem SPINK5-Genprodukt LEKTI und der proteolytischen Aktivität der Kallikreine nahe. Nachdem das SPINK5-Gen hauptsächlich in Mundschleimhaut, Nebenschilddrüse, Bartholindrüsen, Mandeln sowie weniger stark in Lunge, Nieren und Prostata exprimiert wird (Mägert *et al.*, 1999) und die Kallikreine ebenfalls in Nieren, Speicheldrüsen, Schweißdrüsen, Uterus, Plazenta, Haut, Nebenschilddrüse, Prostata (Yousef & Diamandis, 2001) nachgewiesen wurden, bestärkt dies den vermuteten regulatorischen Zusammenhang. Auch die bisherigen Erkenntnisse über die inhibitorische Wirkung von LEKTI und die enzymatische Eigenschaft der 15 Kallikreine sprechen hierfür. Von diesen weisen hK3, hK7 (SCCE), hK9 und hK15 eine Chymotrypsin-artige Enzymeigenschaft auf. Die übrigen 11 zeigen ein Trypsin-ähnliches Verhalten (Yousef & Diamandis, 2001) und stellen damit eine mögliche Zielproteinase für die potentiell bzw. nachweislich inhibitorisch aktiven LEKTI-Domänen dar (Jayakumar *et al.*, 2003; Mägert *et al.*, 1999, 2002 a, b; Mitsudo *et al.*, 2003). Außerdem ist bekannt, dass Trypsineinwirkung das Haarwachstum (Seiberg *et al.*,

1997) und Serinproteinase-Inhibitoren beispielsweise aus der Sojabohne (*Glycine max*) zudem u.a. die Größe von Haarfollikel und -schaft beeinflussen (Seiberg *et al.*, 2001), so dass auch das sogenannte Bambushaar (*Trichorrexis invaginata*) – ein weiteres Symptom des Netherton Syndroms (Mägert *et al.*, 1999) – mit einer übermäßigen Aktivität der Kallikreine, die auch in Haarfollikeln nachgewiesen wurden (Ekholm & Egelrud, 1998), in Zusammenhang gebracht werden kann.

Auch wenn die LEKTI-Domäne 15 gegenüber Kallikrein 5 keine inhibitorische Wirkung zeigt, stellen mit dem momentan vorhandenen Wissen über LEKTI die Kallikreine die wohl am naheliegendsten möglichen, natürlichen Zielproteinasen dar.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Struktur der 15. Domäne des Multidomänen-Inhibitors LEKTI mittels NMR-Spektroskopie bestimmt. Das Vorläuferprotein LEKTI (*lympho-epithelial Kazal-type-related inhibitor*) umfasst fünfzehn Domänen, von denen die 2. und 15. Domäne zwar ein typisches Kazalmotiv zeigen, jedoch anstatt der für klassische Kazalvertreter üblichen sechs 12-13 Reste zwischen den ersten beiden Cysteinen aufweisen. Bei der schweren autosomal rezessiven Erbkrankheit Netherton Syndrom werden Mutationen im LEKTI-Gen gefunden, die eine vorzeitige Termination der Translation verursachen und daher nur zu verkürzt gebildetem LEKTI-Protein führen. Da die LEKTI-Domäne 15 bei Patienten mit Netherton Syndrom nicht exprimiert wird, ist diese besonders interessant.

Einige Symptome des Netherton Syndroms legen eine Fehlregulierung der Proteinase Trypsin nahe, da diese eine Schlüsselrolle bei Überempfindlichkeitsreaktionen und Asthma einnimmt. Bei einem Sequenzvergleich des bislang einzig bekannten natürlich vorkommenden Trypsin-Inhibitors LDTI mit den LEKTI-Domänen wurde eine signifikante Homologie zwischen Domäne 15 und LDTI insbesondere im Bereich der Bindungsschleife gefunden, weswegen eine regulatorische Funktion von LEKTI gegenüber Trypsin vermutet wird.

Nachdem kein natürliches Material zur Verfügung stand, war es zur Gewinnung ausreichender Mengen rekombinanten Proteins, wie es für die Bestimmung der Struktur und der inhibitorischen Wirkung erforderlich ist, notwendig, ein geeignetes Expressions- und Reinigungssystem zu entwickeln. Obwohl es inzwischen einige Hinweise auf eine mögliche Prozessierung von LEKTI gibt, ist die natürliche Proteinsequenz der Domäne 15 noch nicht bekannt.

Nach Vergleichen mit Kazalvertretern wurde ein 76 Aminosäuren großes Protein (dom15) hergestellt. Wie die strukturelle Charakterisierung ergab, ist dessen COOH-terminaler Abschnitt nicht strukturiert, weswegen eine COOH-terminal verkürzte Variante (dom15kurz) hergestellt wurde, die auch die Auflösung von Mehrdeutigkeiten bei NOE-Kreuzresonanzen erlaubte. Aus den homonuklearen und ^{15}N -editierten NMR-Spektren wurden 887 (dom15kurz) bzw. 908 (dom15) experimentelle Randbedingungen gewonnen, die die Berechnung einer jeweils hochaufgelösten Struktur mit einem RMSD-Wert von 0,5 Å für die schweren Atome des Proteinrückgrats bzw. von 1,0 Å für alle schweren Atome ermöglichten.

Beide Varianten zeigen ein typisches Kazal-Strukturmotiv bestehend aus einem dreisträngigen β -Faltblatt, einer zentralen α -Helix und einer exponierten kanonischen Bindungsschleife. Die gegenüber klassischen Kazalvertretern zusätzlichen Reste zwischen den ersten beiden Cysteinen sind teilweise an der Ausbildung einer weiteren aminoterminalen kurzen Helix und

einem *hairpin*-ähnlichen Motiv beteiligt und so angeordnet, dass der klassische Kazal-Faltungstyp nicht gestört wird.

Sowohl die kurze als auch die lange Domäne 15-Variante zeigt eine starke und nicht-temporäre kompetitive Inhibierung von Trypsin und Plasmin mit K_i -Werten im einstelligen nM-Bereich, jedoch keine inhibitorische Wirkung gegenüber Tryptase. Aufgrund des identischen Verhaltens dieser beiden Domäne 15-Varianten gegenüber verschiedenen getesteten Proteinasen ist anzunehmen, dass der COOH-Terminus keinen Einfluss auf die inhibitorische Wirkung der LEKTI-Domäne 15 hat.

Außerdem wurde in Anlehnung an LDTI eine Variante der Domäne 15 mit nur einer Aminosäure zwischen den ersten beiden Cysteinen (dom15ldti) hergestellt. Nach oxidativer Rückfaltung zeigte dom15ldti ebenfalls eine starke inhibitorische Wirkung gegenüber Trypsin und Plasmin, wie sie auch für dom15 und dom15kurz beobachtet wurde. Dies deutet auf eine starke Bindungsschleife und ein hoch stabilisiertes Proteingerüst hin.

Daher wurde ein Strukturmodell für dom15ldti auf Basis der experimentell bestimmten Struktur von dom15kurz erstellt.

Reoxidiertes dom15ldti zeigte eine Inhibierung von Chymotrypsin, Elastase und Subtilisin, während dies weder für dom15 noch für dom15kurz beobachtet wurde. Dies lässt darauf schließen, dass der Bereich zwischen den ersten beiden Cysteinen einen Einfluss darauf hat, welche Proteinase inhibiert wird.

Aus Überlagerungen der Strukturen von dom15kurz und der Modellstruktur von dom15ldti mit verschiedenen Proteinase-Inhibitor-Komplexstrukturen kann eine sterische Hinderung als mögliche Ursache für das unterschiedliche inhibitorische Verhalten gegenüber verschiedenen Proteinasen abgeleitet werden. Diese Erkenntnis stellt eine mögliche Grundlage für gezielte Veränderungen einer inhibitorischen Selektivität dar.

Außerdem erleichtert die Kenntnis der dreidimensionalen Struktur der LEKTI-Domäne 15 die Suche nach der immer noch unbekannten Zielproteinase.

7 Summary

In the present work the structure of the 15th domain of the multidomain inhibitor LEKTI was determined using NMR spectroscopy. The precursor protein LEKTI (*lympho-epithelial Kazal-type-related inhibitor*) consists of fifteen domains, two of which (domain 2 and 15) showing a typical Kazal-type motif but an aberrant spacing of 12-13 residues between the first two cysteines instead of 6 as found for classical Kazal-type-inhibitors. The severe autosomal recessive disease Netherton Syndrome is linked to mutations in the gene encoding LEKTI generating premature stop codons and thus leading to a truncated LEKTI polypeptide. Therefore, especially the 15th domain of LEKTI is of particular interest as it is never expressed in Netherton Syndrome patients investigated so far.

Some symptoms of Netherton Syndrome suggest an association with a misregulation of the proteinase tryptase that is known to act as a key mediator for hypersensitivity reaction and for asthma. A sequence alignment of the only known naturally occurring tryptase inhibitor LDTI with the different LEKTI domains reveals a significant similarity between LDTI and domain 15 of LEKTI, especially for the region of the binding loop. Therefore, a regulatory function of LEKTI towards tryptase activity is expected.

For sufficient amounts of protein for structure determination and inhibiting assays an efficient system for the recombinant expression and purification of domain 15 was established, as no naturally derived material was available. Although there are some hints for processing of LEKTI, the naturally processed form of domain 15 and therefore its exact length is still unknown.

Based on comparison to known Kazal-type inhibitors, a fragment of 76 amino acid residues was produced (dom15). As structural investigations revealed that the COOH-terminal amino acid residues are unstructured, a COOH-terminally truncated fragment containing 59 amino acid residues (dom15short) was produced to solve NOE-ambiguities. Based on homonuclear and ^{15}N -edited NMR spectra 887 respectively 908 experimental restraints were determined for dom15short and dom15 structure calculations leading to well defined structures with rmsd values for structured regions of 0,5 Å for the backbone and 1,0 Å for all heavy atoms, respectively.

Both variants show the typical Kazal-fold with a three stranded β -sheet, a central α -helix and an exposed canonical inhibitory loop. The additional residues in the region between the first and second cysteine are partially involved in an additional short aminoterminal helix and a hairpin-like motif, and are orientated in a way that the classical Kazal-scaffold is not dis-

turbed.

The short and the long form of domain 15 both exhibit an efficient and permanent competitive inhibition of trypsin and plasmin with K_i -values in the lower of nM-range, but no inhibitory activity against tryptase. Due to the identical behavior of these two forms of domain 15 against various tested proteinases, the COOH-terminus seems to have no effect on inhibitory activity of LEKTI domain 15.

In addition, another variant of domain 15 with only one residue between the first two cysteines was constructed in accordance to the tryptase inhibitor LDTI (dom15ldti). After oxidative refolding dom15ldti had the same strong inhibitory effect against trypsin and plasmin as observed for dom15short and dom15, indicating a rigid inhibitory loop and a well stabilized protein scaffold. Therefore, a model structure of the dom15ldti was created on the basis of the experimentally determined structure of dom15short.

Reoxidized dom15ldti inhibits chymotrypsin, elastase, and subtilisin while neither dom15short nor dom15 does. Therefore, the region between the first two cysteines seems to have an effect on the selection which proteinases are inhibited. By fitting and overlaying the structure of dom15short and a model structure of dom15ldti on known proteinase-inhibitor-complexes, a sterical hindrance can be deduced as possible reason for the different inhibitory behavior against various proteinases. This knowledge provides a basis for a rational manipulation of the inhibitory selectivity.

Also, the knowledge of the three-dimensional structure of the 15th domain of LEKTI and its variants will assist in the search for its hitherto unknown target proteinases.

8 Abkürzungsverzeichnis

ϵ	molarer Extinktionskoeffizient
ω	Frequenz
1D	eindimensional
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
$[\Theta]_{\text{MRW}}$	mittlere residuale Elliptizität
Å	10^{-10}m
AAT	$\alpha 1$ -Antitrypsin
Abb.	Abbildung
AIDS	<i>acquired immunodeficiency syndrome</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATI	<i>ascidian trypsin inhibitor</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATT _P	<i>Arabidopsis thaliana trypsin inhibitor precursor</i>
BAPNA	N- α -Benzoyl-arginin-p-nitroanilid
BCA	Bicinchoninsäure
BMRB	<i>Biological Magnetic Resonance Data Bank</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
BUSI	<i>bull seminal plasma inhibitor</i>
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
C18	octadecyl
CD	Circulardichroismus
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CIAP	calf intestinale alkaline phosphatase
COSY	correlated spectroscopy
CSI	Chemischer Verschiebungsindex
D	Dimension
Da	Dalton
DALI	<i>distance matrix alignment</i>
ddNTP	2'-3'-Didesoxynukleosid-5'-triphosphat
deg	Grad
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
dsDNA	Doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
DSS	2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonsäure
DTT	1,4-Dithiothreitol (2,3-Dihydroxy-1,4-dithiolbutan)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC	Enzymkommission-Nummer
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EK	Spaltstelle für Enterokinase
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ESI	<i>elektrospray-ionization</i>
FID	<i>free induction decay</i>
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
FT	Fourier Transformation
GPdom15	LEKTI-Domäne 15 (Asp989-Glu1076) mit zusätzlicher aminoterminaler Gly-Pro-Sequenz
GPdom15kurz	LEKTI-Domäne 15 (Asp989-Glu1047) mit zusätzlicher aminoterminaler Gly-Pro-Sequenz

GPdom15ldti	Mutante von GPdom15kurz, bei der Lys994-Leu1005-Bereich durch ein Alanin substituiert ist
hK5	humanes Kallikrein 5
HMQC	<i>heteronuclear multiple quantum correlated spectroscopy</i>
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HSQC	heteronuclear single quantum correlated spectroscopy
IgE	Immunglobulin E
IPTG	Isopropyl-1-thio- β -D-galaktopyranosid
K	Kelvin
k	kilo (1000) bzw. bei NMR (NS, TD): 1024
Kap.	Kapitel
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani (Medium)
LDTI	<i>leech derived tryptase inhibitor</i>
LEKTI	Lympho-epithelialer Kazaltyp-verwandter Inhibitor
M	mol/l
M9	M9-Minimalmedium
MALDI	<i>matrix assisted laser desorption ionization</i>
mAU	Milli-Absorptionseinheiten
MCS	Erweiterte Klonierungsstelle (<i>multiple cloning site</i>)
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
NMR	kernmagnetische Resonanz
NOE	<i>nuclear Overhauser enhancement / effect</i> bzw. Kreuzresonanz im NOESY-Spektrum
NOESY	<i>nuclear Overhauser enhancement spectroscopy</i>
NS	Anzahl der akkumulierten FIDs
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
OMSVP3	<i>ovomucoid silver pheasant domain 3</i>
OMTKY2	<i>ovomucoid turkey domain 2</i>
OMTKY3	<i>ovomucoid turkey domain 3</i>
PAR-2	<i>protease-activated receptor-2</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDB	Protein Data Bank
PEC-60	60 Aminosäuren großes Protein mit aminoterminalen Glutamat und carboxyterminalen Cystein
PEG	Polyethylenglykol
PMN	polymorph-kernig
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
ppm	Teile pro Millionen
PreS	Spaltstelle für PreScission-Protease
PreScission	PreScission-Protease
PSTI	<i>pancreatic secretory trypsin inhibitor</i>
RMSD	mittlere quadratische Standardabweichung
RNA	Ribonukleinsäure
RP	Umkehrphasen
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkriptase
s	Sekunde
SARS	<i>severe acute respiratory syndrome</i>
s.o.	siehe oben
SCCE	<i>stratum corneum chymotryptic enzyme</i>
SCTE	<i>stratum corneum tryptic enzyme</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEC	Größenausschluss-Chromatographie
SFTI	<i>sun flower trypsin inhibitor</i>

SLPI	<i>secretory leukocyte proteinase inhibitor</i>
SPC	<i>Subtilisin like Proprotein Convertase</i>
SPCI	<i>schizolobium parahyba chymotrypsin inhibitor</i>
SPINK	serine protease inhibitor kazal-type
ssDNA	einzelsträngige Desoxyribonukleinsäure
SSM	<i>secondary structure matching</i>
St	Proteinstandard
SW	spektrale Weite
Tab.	Tabelle
tag	Anhang
TBE	Tris-Borat-EDTA
TD	Zahl der komplexen Datenpunkte
TEMED	N-,N-,N',N'-Tetramethylenethyldiamin
TFA	Trifloressigsäure
TOCSY	<i>total correlated spectroscopy</i>
TOF	<i>time of flight</i>
TPCK	N-Tosyl-L-Phenylalanin-Chlormethyl-Keton
TPPI	<i>time proportional phase incrementation</i>
Tris	α,α,α -Tris-(hydroxymethyl)-methylamin
Trx	Thioredoxin
U	Unit
u.a.	unter anderem
ÜNK	Übernachtkultur
UV	ultraviolett
v/v	Volumen je Volumen
Vol.	Bettvolumen (Säulenmaterial)
w/v	Gewicht je Volumen
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel

9 Literaturverzeichnis

- Ahmed A., Kandola P., Ziada G. & Parenteau N. (2001) Purification and partial amino acid sequence of proteins from human epidermal keratinocyte conditioned medium. *J. Protein Chem.*, **20**, 273-278.
- Ahmed A. K., Schaffer S. W. & Wetlaufer D. B. (1975) Nonenzymic reactivation of reduced bovine pancreatic ribonuclease by air oxidation and by glutathione oxidoreduction buffers. *J. Biol. Chem.*, **250**, 8477-8482.
- Anderson K. S. (2002) Perspectives on the molecular mechanism of inhibition and toxicity of nucleoside analogs that target HIV-1 reverse transcriptase. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1587**, 296-299.
- Apostoluk W. & Otlewski J. (1998) Variability of the canonical loop conformations in serine proteinases inhibitors and other proteins. *Proteins*, **32**, 459-474.
- Apweiler R., Bairoch A., Wu C. H., Barker W. C., Boeckmann B., Ferro S., Gasteiger E., Huang H., Lopez R., Magrane M., Martin M. J., Natale D. A., O'Donovan C., Redaschi N. & Yeh L. S. (2004) UniProt: the Universal Protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res.*, **32**, 115-119.
- Ardelt W. & Laskowski M. Jr. (1985) Turkey ovomucoid third domain inhibits eight different serine proteinases of varied specificity on the same ...Leu18-Glu19 ... reactive site. *Biochemistry*, **24**, 5313-5320.
- Asao T., Takahashi K. & Tashiro M. (1998) Interaction of second and third domains of Japanese quail ovomucoid with ten mammalian trypsins. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1387**, 415-421.
- Aue W. P., Bartholdi E. & Ernst R. R. (1976) Two-dimensional spectroscopy. Application to nuclear magnetic resonance. *J. Chem. Phys.*, **64**, 2229-2246.
- Auerswald E. A., Morenweiser R., Sommerhoff C. P., Piechottka G. P., Eckerskorn C., Gurtler L. G. & Fritz H. (1994) Recombinant leech-derived tryptase inhibitor: construction, production, protein chemical characterization and inhibition of HIV-1 replication. *Biol. Chem. Hoppe Seyler*, **375**, 695-703.
- Bagarozzi D. A. Jr. & Travis, J. (1998) Ragweed pollen proteolytic enzymes: possible roles in allergies and asthma. *Phytochemistry*, **47**, 593-598.
- Bagarozzi J., Da P. J. & Travis J (1998) Purification and characterization of an arginine-specific peptidase from ragweed (*ambrosia artemisifolia*) pollen. *Am. J. Resp. Cell. Mol. Biol. (USA)*, **18**, 363-369.
- Barkhuijsen H., de Beer R., Bovée W. M. M. J. & van Ormondt D. (1985) Retrieval of fre-

- quencies, amplitudes, damping factors, and phases from time-domain signals using a linear least-squares procedure. *J. Magn. Reson.*, **61**, 465-481.
- Barrett A. J., Rawlings N. D. & O'Brien E. A. (2001) The MEROPS database as a protease information system. *J. Struct. Biol.*, **134**, 95-102.
- Baumann H., Morella K. K., Campos S. P., Cao Z. & Jahreis G. P. (1992) Role of CAAT-enhancer binding protein isoforms in the cytokine regulation of acute-phase plasma protein genes. *J. Biol. Chem.*, **267**, 19744-19751.
- Bax A. & Grzesiek S. (1993) Methodological Advances in Protein NMR. *Acc. Chem. Res.*, **26**, 131-138.
- Beeser S. A., Goldenberg D. P. & Oas T. G. (1997) Enhanced protein flexibility caused by a destabilizing amino acid replacement in BPTI. *J. Mol. Biol.*, **269**, 154-164.
- Berger A. (2000) PAR2 antagonists-the next generation of anti- inflammatories? *BMJ*. 2000 Feb 5;320(7231):334.
- Berman H. M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T. N., Weissig H., Shindyalov I. N. & Bourne P. E. (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, **28**, 235-242.
- Betzl C., Dauter Z., Genov N., Lamzin V., Navaza J., Schnebli H. P. *et al.* (1993) Structure of the proteinase inhibitor eglin c with hydrolysed reactive centre at 2.0 Å resolution. *FEBS Lett.*, **317**, 185-188.
- Bhatia E., Choudhuri G., Sikora S. S., Landt O., Kage A., Becker M. & Witt H. (2002) Tropical calcific pancreatitis: strong association with SPINK1 trypsin inhibitor mutations. *Gastroenterology*, **123**, 1020-1025.
- Bieth J. G. (1995) Theoretical and practical aspects of proteinase inhibition kinetics. In: Perlmann C. E. & Lorand L. (Eds.) *Methods in Enzymology*, Vol. 248, Academic Press, New York / London, 59-84.
- Bigler T. L., Lu W., Park S. J., Tashiro M., Wieczorek M., Wynn R. & Laskowski M. Jr. (1993) Binding of amino acid side chains to preformed cavities: interaction of serine proteinases with turkey ovomucoid third domains with coded and noncoded P1 residues. *Protein Sci.*, **2**, 786-799.
- Bitoun E., Bodemer C., Amiel J., de Prost Y., Stoll C., Calvas P. & Hovnanian A. (2002 a) Prenatal diagnosis of a lethal form of Netherton syndrome by SPINK5 mutation analysis. *Prenat. Diagn.*, **22**, 121-126.
- Bitoun E., Chavanas S., Irvine A. D., Lonie L., Bodemer C., Paradisi M., Hamel-Teillac D., Ansai S., Mitsuhashi Y., Taieb A., de Prost Y., Zambruno G., Harper J. I. & Hovnanian A. (2002 b) Netherton syndrome disease expression and spectrum of SPINK5 mutations in 21 families. *J. Invest. Dermatol.*, **118**, 352-361.

- Bitoun E., Micheloni A., Lamant L., Bonnart C., Tartaglia-Polcini A., Cobbold C., Saati T. A., Mariotti F., Mazereeuw-Hautier J., Boralevi F., Hohl D., Harper J., Bodemer C., D'Alesio M. & Hovnanian A. (2003,)LEKTI proteolytic processing in human primary keratinocytes, tissue distribution, and defective expression in Netherton syndrome. *Hum. Mol. Genet.*, **12**, 2417-2430.
- Bjellqvist B., Basse B., Olsen E. & Celis J. E. (1994) Reference points for comparisons of two-dimensional maps of proteins from different human cell types defined in a pH scale where isoelectric points correlate with polypeptide compositions. *Electrophoresis*, **15**, 529-539.
- Bjellqvist B., Hughes G. J., Pasquali Ch., Paquet N., Ravier F., Sanchez J.-Ch., Frutiger S. & Hochstrasser D.F. (1993) The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences. *Electrophoresis*, **14**, 1023-1031.
- Bode W. & Huber R. (1992) Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. *Eur. J. Biochem.*, **204**, 433-451.
- Bode W. & Huber R. (2000) Structural basis of the endoproteinase-protein inhibitor interaction. *Biochim. Biophys. Acta*, **1477**, 241-252.
- Bodenhausen G., Kogler H. & Ernst R. R. (1984) Selection of Coherence Transfer Pathways in NMR Pulse Experiments. *J. Magn. Reson.*, **58**, 370-388.
- Bodey B., Bodey B. Jr, Siegel S. E. & Kaiser H. E. (2000) Novel insights into the function of the thymic Hassall s bodies. *In Vivo*, **14**, 407-418.
- Boeckmann B., Bairoch A., Apweiler R., Blatter M.-C., Estreicher A., Gasteiger E., Martin M.J., Michoud K., O'Donovan C., Phan I., Pilbout S. & Schneider M. (2003) The Swiss-Prot protein knowledgebase and its supplement TrEMBL in 2003. *Nucleic Acids Res.*, **31**: 365-370.
- Bolognesi M., Gatti G., Menagatti E., Guarneri M., Marquart M., Papamokos E. & Huber R. (1982) Three-dimensional structure of the complex between pancreatic secretory trypsin inhibitor (Kazal type) and trypsinogen at 1.8 Å resolution. Structure solution, crystallographic refinement and preliminary structural interpretation. *J. Mol. Biol.*, **162**, 839-868.
- Bourinbaïar A. S. (1991) HIV and GAG. *Nature*, **349**, 111.
- Braun W., Bösch C., Brown L. R., Go N. & Wüthrich K. (1981) Combined use of proton-proton Overhauser enhancements and a distance geometry algorithm for determination of polypeptide conformations. Application to micelle-bound glucagon. *Biochim. Biophys. Acta.*, **667**, 377-396.
- Braunschweiler L. & Ernst R. R. (1983) Coherence Transfer by Isotropic Mixing: Application to Proton Correlation Spectroscopy. *J. Magn. Reson.*, **53**, 521-528.

- Brooks B. R., Brucelori R. E., Olafson B. D., States D. J., Swaminathan S., & Karplus. M. (1983) CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *J. Comput. Chem.*, **4**, 187-217.
- Brünger A.T. & Nilges M. (1993) Computational challenges for macromolecular structure determination by X-ray crystallography and solution NMR-spectroscopy. *Quart. Rev. Biophys.*, **26**, 49-125.
- Brünger A.T. (1993) X-PLOR Version 3.1: A system for X-ray crystallography and NMR. Howard Hughes Medical Institute & Yale University Press, New Haven.
- Catterall J. F., Stein J. P., Kristo P., Means A. R. & O'Malley B. W. (1980) Primary sequence of ovomucoid messenger RNA as determined from cloned complementary DNA. *J. Cell. Biol.*, **87**, 480-487.
- Cavanagh J. & Rance M. (1992) Suppression of Cross-Relaxation Effects in TOCSY Spectra via a Modified DIPSI-2 Mixing Sequence. *J. Magn. Reson.*, **96**, 670-678.
- Cavanagh J., Fairbrother W. J., Palmer A. G. 3rd & Skelton N. J. (1996) Protein NMR Spectroscopy. Academic Press, San Diego.
- Chakrabartty A., Kortemme T., Padmanabhan S. & Baldwin R. L. (1993) Aromatic side-chain contribution to far-ultraviolet circular dichroism of helical peptides and its effect on measurement of helix propensities. *Biochemistry*, **32**, 5560-5565.
- Chase T. Jr. & Shaw E. (1967) p-Nitrophenyl-p-guanidinobenzoate HCl: a new active site titrant for trypsin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **29**, 508-514.
- Chase T. Jr. & Shaw E. (1969) Comparison of the esterase activities of trypsin, plasmin, and thrombin on guanidinobenzoate esters. Titration of the enzymes. *Biochemistry*, **8**, 2212-2224.
- Chavanas S., Bodemer C., Rochat A., Hamel-Teillac D., Ali M., Irvine A. D., Bonafe J. L., Wilkinson J., Taieb A., Barrandon Y., Harper J. I., de Prost Y. & Hovnanian A. (2000 a) Mutations in SPINK5, encoding a serine protease inhibitor, cause Netherton syndrome. *Nat. Genet.*, **25**, 141-142.
- Chavanas S., Garner C., Bodemer C., Ali M., Teillac D. H., Wilkinson J., Bonafe J. L., Paradisi M., Kelsell D. P., Ansai S., Mitsuhashi Y., Larregue M., Leigh I. M., Harper J. I., Taieb A., Prost Y., Cardon L. R., Hovnanian A. (2000 b) Localization of the Netherton syndrome gene to chromosome 5q32, by linkage analysis and homozygosity mapping. *Am. J. Hum. Genet.*, **66**, 914-921.
- Clauser K. R., Baker P. R. & Burlingame A. L. (1999) Role of accurate mass measurement (+/- 10 ppm) in protein identification strategies employing MS or MS/MS and database searching. *Anal. Chem.*, **71**, 2871-2882.

- Clore G. M., Gronenborn A. M., Nilges M. & Ryan C. A. (1987) Three-dimensional structure of potato carboxypeptidase inhibitor in solution. A study using nuclear magnetic resonance, distance geometry, and restrained molecular dynamics. *Biochemistry*, **26**, 8012-8023.
- Clore G.M. & Gronenborn A. M. (1989) Determination of three-dimensional structures of proteins and nucleic acids in solution by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **24**, 479-564.
- Cohen S. N., Chang A. C. & Hsu L. (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc.Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**, 2110-2114.
- Comèl M. (1949) Ichthyosis linearis circumflexa. *Dermatol.*, **98**, 133-136.
- Cookson W.O. & Moffatt M.F. (2000) Genetics of asthma and allergic disease. *Hum. Mol. Genet.*, **9**, 2359 -2364.
- Crowther D. C. (2002) Familial conformational diseases and dementias. *Hum. Mutat.*, **20**, 1-14.
- Czapinska H. & Otlewski J. (1999) Structural and energetic determinants of the S1-site specificity in serine proteases. *Eur. J. Biochem.*, **260**, 571-595.
- Dayie K. T. & Wagner G. (1994) Relaxation-Rate Measurements for ^{15}N - ^1H Groups with Pulsed-Field Gradients and Preservation of Coherence Pathways. *J. Magn. Reson. A*, **111**, 121-126.
- De Clercq E. (2004) HIV-chemotherapy and -prophylaxis: new drugs, leads and approaches. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, **36**, 1800-1822.
- Deadman J. (2000) Proteinase inhibitors and activators strategic targets for therapeutic intervention. *J. Pept. Sci.*, **6**, 421-431.
- Derian C. K., Eckardt A. J. & Andrade-Gordon P. (1997) Differential regulation of human keratinocyte growth and differentiation by a novel family of protease-activated receptors. *Cell Growth Differ.*, **8**, 743-749.
- Derman A. I., Prinz W. A., Belin, D. & Beckwith, J. (1993) Mutations that allow disulfide bond formation in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Science*, **262**, 1744-1747.
- Dery O., Corvera C. U., Steinhoff M. & Bunnett N. W. (1998) Proteinase-activated receptors: novel mechanisms of signaling by serine proteases. *Am. J. Physiol.*, **274**, 1429-1452.
- Di Marco S. & Priestle J. P. (1997) Structure of the complex of leech-derived tryptase inhibitor (LDTI) with trypsin and modeling of the LDTI-tryptase system. *Structure*, **5**, 1465-1474.
- Douek D. C. & Altmann D. M. (2000) T-cell apoptosis and differential human leucocyte antigen class II expression in human thymus. *Immunology*, **99**, 249-256.

- Dower W. J., Miller J. F. & Ragsdale C. W. (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.*, **16**, 6127-6145.
- Duguay S. J., Milewski W. M., Young B. D., Nakayama K. & Steiner D. F. (1997) Processing of wild-type and mutant proinsulin-like growth factor-IA by subtilisin-related proprotein convertases. *J. Biol. Chem.*, **272**, 6663-6670.
- Düx P., Whitehead B., Boelens R., Kaptein R. & Vuister G. W. (1997) Measurements of ^{15}N - ^1H couplings constants in uniformly ^{15}N -labeled proteins: Application to the photoactive yellow protein. *J. Biomol. NMR*, **10**, 301-306.
- Eckholm E. & Egelrud T. (1998) The expression of stratum corneum chymotryptic enzyme in human anagen hair follicles: further evidence for its involvement in desquamation-like processes. *Br. J. Dermatol.*, **139**, 585-590.
- Eriksson S. (1996) A 30-year perspective on alpha 1-antitrypsin deficiency. *Chest*, **110**, 237S-242S.
- Erlanger B. F., Kokowsky N. & Cohen W. (1961) The preparation and properties of two new chromagenic substrates of trypsin. *Arch. Biochim. Biophys.*, **95**, 271-278.
- Evnin L. B., Vasquez J. R. & Craik C. S. (1990) Substrate specificity of trypsin investigated by using a genetic selection. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **87**, 6659-6663.
- Falquet L, Pagni M, Bucher P, Hulo N, Sigrist CJ, Hofmann K & Bairoch A. (2002) The PROSITE database, its status in 2002. *Nucleic Acids Res.*, **30**, 235-238.
- Fink E., Rehm H., Gippner C., Bode W., Eulitz M., Machleidt W. & Fritz H. (1986) The primary structure of bdellin B-3 from the leech *Hirudo medicinalis*. Bdellin B-3 is a compact proteinase inhibitor of a "non-classical" Kazal type. It is present in the leech in a high molecular mass form. *Biol. Chem. Hoppe Seyler*, **367**, 1235-1242
- Fischer S., Dunbrack R. L. Jr. & Karplus M. (1994) Cis- Trans Imide Isomerization of the Proline Dipeptide. *J. Am. Chem. SOC.*, **116**, 11931-11937.
- Franzke C. W., Baici A., Bartels J., Christophers E. & Wiedow O. (1996) Antileukoprotease inhibits stratum corneum chymotryptic enzyme. Evidence for a regulative function in desquamation. *J. Biol. Chem.*, **271**, 21886-21890.
- Frenkiel T., Bauer C., Carr M. D., Birdsall B. & Feeney J. (1990) HMQC-NOESY-HMQC, a Three-Dimensional NMR Experiment Which Allows Detection of Nuclear Overhauser Effects between Protons with Overlapping Signals. *J. Magn. Reson.*, **90**, 420-425.
- Friedrich M. S. (1995) A Model-free algorithm for the removal of baseline artifacts. *J. Biomol. NMR*, **5**, 147-153.
- Friedrich T., Kroger B., Bialojan S., Lemaire H. G., Hoffken H. W., Reuschenbach P., Otte

- M. & Dodt J. (1993) A Kazal-type inhibitor with thrombin specificity from *Rhodnius prolixus*. *J. Biol. Chem.*, **268**, 16216-16222.
- Fritz H., Hartwich G. & Werle E. (1966) On protease inhibitors. I. Isolation and characterization of trypsin inhibitors from dog pancreas tissue and pancreas secretion. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.*, **345**, 150-67.
- Fujii T., Nakamura T. & Iwamoto A. (2004) Current concepts in SARS treatment. *J. Infect. Chemother.*, **10**, 1-7.
- Gasteiger E., Gattiker A., Hoogland C., Ivanyi I., Appel R. D. & Bairoch A. (2003) ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res.*, **31**, 3784-3788.
- Gattiker A., Bienvenut W. V., Bairoch A. & Gasteiger E. (2002 a) FindPept, a tool to identify unmatched masses in peptide mass fingerprinting protein identification. *Proteomics*, **2**, 1435-1444.
- Gattiker A., Gasteiger E. & Bairoch A. (2002 b) ScanProsite: a reference implementation of a PROSITE scanning tool. *Applied Bioinformatics*, **1**, 107-108.
- Giacomini M., McDermott J. L., Giri A. A., Martini I., Lillo F. B., Varnier O.E. (1998) A novel and innovative quantitative kinetic software for virological colorimetric assays. *J. Virol. Methods.*, **73**, 201-209.
- Gill S. C. & von Hippel P. H. (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.*, **182**, 319-326.
- Grant S. G., Jessee J., Bloom F. R. & Hanahan D. (1990) Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 4645-4649.
- Greene L.J. & Bartelt D. C. (1969) The structure of the bovine pancreatic secretory trypsin inhibitor--Kazal's inhibitor. II. The order of the tryptic peptides. *J. Biol. Chem.*, **244**, 2646-2657.
- Greenfield N. J. (1996) Methods to estimate the conformation of proteins and polypeptides from circular dichroism data. *Anal. Biochem.*, **235**, 1-10.
- Greenfield, N. & Fasman, G. D. (1969) Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry*, **8**, 4108-4116.
- Greens N. M: & Neurath H. (1954) In: Neurath H. & Bailey K. (Eds.) *The Proteins*, Academic Press, New York, 1057-1171.
- Grütter M. G., Priestle J. P., Rahuel J., Grossenbacher H., Bode W., Hofsteenge J. & Stone S. R. (1990) Crystal structure of the thrombin-hirudin complex: a novel mode of serine protea-

- se inhibition. *EMBO J.*, **9**, 2361-2365.
- Grzesiek S. & Bax A. (1993) Amino acid type determination in the sequential assignment procedure of uniformly $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -enriched proteins. *J. Biomol. NMR*, **3**, 185-204.
- Hagihara Y., Shiraki K., Nakamura T., Uegaki K., Takagi M., Imanaka T. & Yumoto N. (2002) Screening for stable mutants with amino acid pairs substituted for the disulfide bond between residues 14 and 38 of bovine pancreatic trypsin inhibitor (BPTI). *J. Biol. Chem.*, **277**, 51043-51048.
- Hanahan D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, **166**, 557-580.
- Hatsuzawa K., Murakami K. & Nakayama K. (1992) Molecular and enzymatic properties of furin, a Kex2-like endoprotease involved in precursor cleavage at Arg-X-Lys/Arg-Arg sites. *J. Biochem. (Tokyo)*, **111**, 296-301.
- Hattori T., Koito A., Takatsuki K., Kido H. & Katunuma N. (1989) Involvement of tryptase-related cellular protease(s) in human immunodeficiency virus type 1 infection. *FEBS Lett*, **248**, 48-52.
- Hawdon J. M., Datu B. & Crowell M. (2003) Molecular cloning of a novel multidomain Kunitz-type proteinase inhibitor from the hookworm *Ancylostoma caninum*. *J. Parasitol.*, **89**, 402-407.
- He S., Gaca M. D. & Walls A.F. (1998) A role for tryptase in the activation of human mast cells: modulation of histamine release by tryptase and inhibitors of tryptase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **286**, 289-297.
- He S., Peng Q. & Walls, A.F. (1997) Potent induction of a neutrophil and eosinophil-rich infiltrate *in vivo* by human mast cell tryptase: selective enhancement of eosinophil recruitment by histamine. *J. Immunol.*, **159**, 6216-6225.
- Hecht H. J., Szardenings M., Collins J. & Schomburg D. (1991) Three-dimensional structure of the complexes between bovine chymotrypsinogen A and two recombinant variants of human pancreatic secretory trypsin inhibitor (Kazal-type). *J. Mol. Biol.*, **220**, 711-722.
- Hecht H. J., Szardenings M., Collins J. & Schomburg D. (1992) Three-dimensional structure of a recombinant variant of human pancreatic secretory trypsin inhibitor (Kazal type). *J. Mol. Biol.*, **225**, 1095-1103.
- Helland R., Otlewski J., Sundheim O., Dadlez M., & Smalas A. O. (1999) The crystal structures of the complexes between bovine xxxbeta-trypsin and ten P1 variants of BPTI. *J. Mol. Biol.*, **287**, 923-942.
- Hemmi H., Kumazaki T., Yamazaki T., Kojima S., Yoshida T., Kyogoku Y., Katsu M., Shinohara F., Yokosawa H., Miura K. I. & Kobayashi Y. (2003) Inhibitory Specificity Change

- of the Ovomucoid Third Domain of the Silver Pheasant upon Introduction of an Engineered Cys(14)-Cys(39) Bond. *Biochemistry*, **42**, 2524-2534.
- Hemmi H., Yoshida T., Kumazaki T., Nemoto N., Hasegawa J., Nishioka F., Kyogoku Y., Yokosawa H. & Kobayashi Y. (2002) Solution structure of ascidian trypsin inhibitor determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry*, **41**, 10657-10664.
- Hink-Schauer C., Estebanez-Perpina E., Wilharm E., Fuentes-Prior P., Klinkert W., Bode W. & Jenne D. E. (2002) The 2.2-Å crystal structure of human pro-granzyme K reveals a rigid zymogen with unusual features. *J. Biol. Chem.*, **277**, 50923-50933.
- Hocini H., Becquart P., Bouhlal H., Adle-Biasette H., Kazatchkine M. D. & Belec L. (2000) Secretory leukocyte protease inhibitor inhibits infection of monocytes and lymphocytes with human immunodeficiency virus type 1 but does not interfere with transcytosis of cell-associated virus across tight epithelial barriers. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **7**, 515-518.
- Hohenester E., Maurer P. & Timpl R. (1997) Crystal structure of a pair of follistatin-like and EF-hand calcium-binding domains in BM-40. *EMBO J.*, **16**, 3778-3786.
- Hol W. G. J. (1985) The role of the α -helix dipole in protein function and structure. *Progr. Biophys. Mol. Biol.*, **45**, 149-195.
- Holak T. A., Gondol D., Otlewski J. & Wilusz T. (1989) Determination of the complete three-dimensional structure of the trypsin inhibitor from squash seeds in aqueous solution by nuclear magnetic resonance and a combination of distance geometry and dynamical simulated annealing. *J. Mol. Biol.*, **210**, 635-648.
- Hollenberg M. D. (2003) Proteinase-mediated signaling: proteinase-activated receptors (PARs) and much more. *Life Sci.*, **74**, 237-246.
- Holm L. & Sander C. (1996) Mapping the protein universe. *Science*, **273**, 595-602.
- Holm, L. & Sander, C. (1993) Protein structure comparison by alignment of distance matrices. *J. Mol. Biol.*, **233**, 123-138.
- Hoogstraten C. G., Choe S., Westler W. M. & Markley J. L. (1995) Comparison of the accuracy of protein solution structures derived from conventional and network-edited NOESY data. *Protein Sci.*, **4**, 2289-2299.
- Horn J. R., Ramaswamy S. & Murphy K. P. (2003) Structure and Energetics of Protein-Protein Interactions: The Role of Conformational Heterogeneity in Omtky3 Binding to Serine Proteases. *J. Mol. Biol.*, **331**, 497-508.
- Hosaka M., Nagahama M., Kim W. S., Watanabe T., Hatsuzawa K., Ikemizu J., Murakami K. & Nakayama K. (1991) Arg-X-Lys/Arg-Arg motif as a signal for precursor cleavage catalyzed by furin within the constitutive secretory pathway. *J. Biol. Chem.*, **266**, 12127-12130.

- Hou L., Kapas S., Cruchley A. T., Macey M. G., Harriott P., Chinni C., Stone S. R. & Howells G. L. (1998) Immunolocalization of proteaseactivated receptor-2 in skin: receptor activation stimulates interleukin-8 secretion by keratinocytes *in vitro*. *Immunology*, **94**, 356-362.
- Huber R. & Bode W. (1978) Structural basis of the activation and action of trypsin. *Acc. Chem. Res.*, **11**, 114-122.
- Hull W. E. & Sykes B. D. (1975) Dipolar nuclear spin relaxation of ^{19}F in multispin systems. Application to ^{19}F labeled proteins. *J. Chem. Phys.*, **63**, 867-880.
- Hulo N., Sigrist C. J. A., Le Saux V., Langendijk-Genevaux P. S., Bordoli L., Gattiker A., De Castro E., Bucher P. & Bairoch A. (2004) Recent improvements to the PROSITE database. *Nucl. Acids. Res.*, **32**, 134-137.
- Hurle M. R, Marks C. B., Kosen P. A., Anderson S. & Kuntz I. D. (1990) Denaturant-dependent folding of bovine pancreatic trypsin inhibitor mutants with two intact disulfide bonds. *Biochemistry*, **29**, 4410-4419.
- Hutchinson E. G. & Thornton J. M. (1996) PROMOTIF--a program to identify and analyze structural motifs in proteins. *Protein Sci.*, **5**, 212-220.
- Hwang T.-L. & Shaka A. J. (1995) Water suppression that works. Excitation sculpting using arbitrary waveforms and pulsed field gradients. *J. Magn. Reson. A*, **112**, 275-279.
- Ibrahim B. S. & Pattabhi V. (2004) Crystal Structure of Trypsin-Turkey Egg White Inhibitor Complex. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **313**, 8-16.
- Ikura M., Bax A., Clore G. M. & Gronenborn A. M. (1990) Detection of Nuclear Overhauser Effects between Degenerate Amide Proton Resonances by Heteronuclear Three-Dimensional Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 9020-9022.
- Innis C. A. & Hyvonen M. (2003) Crystal structures of the heparan sulfate-binding domain of follistatin. Insights into ligand binding. *J. Biol. Chem.*, **278**, 39969-39977.
- Inoue M., Hoshino T., Fukuma T., Niwa Y. & Kido H. (1994) Close co-localization of CD4 and a serine esterase tryptase TL2 on the cell-surface of human monocytoïd and CD4+ lymphoid cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **201**, 1390-1395.
- Jack A. & Levitt M. (1978) Refinement of Large Structures by Simultaneous Minimization of Energy and R Factor. *Acta Crystallogr.* **A34**, 931-935.
- Jackson R. M. (1999) Comparison of protein-protein interactions in serine protease-inhibitor and antibody-antigen complexes: implications for the protein docking problem. *Protein Sci.*, **8**, 603-613.
- Jayakumar A., Kang Y., Mitsudo K., Henderson Y., Frederick M. J., Wang M., El-Naggar A.

- K., Marx U. C., Briggs K. & Clayman G. L. (2004) Expression of LEKTI domains 6-9' in the baculovirus expression system: recombinant LEKTI domains 6-9' inhibit trypsin and subtilisin A. *Protein Expr. Purif.*, **35**, 93-101.
- Jeener J., Meier B. H., Bachmann P. & Ernst R. R. (1979) Investigation of exchange processes by two-dimensional NMR spectroscopy. *J. Chem. Phys.*, **71**, 4546-4553.
- Johnson B. A. & Blevins R. A. (1994) NMRView: A computer program for the visualization and analysis of NMR data. *J. Biomol. NMR*, **4**, 603-614.
- Johnson K. D., Clark A. & Marshall S. (2002) A functional comparison of ovine and porcine trypsins. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, **131**, 423-31.
- Judge M. R., Morgan G. & Harper J. I. (1994) A clinical and immunological study of Nether-ton's syndrome. *Br. J. Dermatol.*, **131**, 615-621.
- Kabsch W. & Sander C. (1983) Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers*, **22**, 2577-2637.
- Kanke T., Macfarlane S. R., Seatter M. J., Davenport E., Paul A., McKenzie R. C. & Plevin R. (2001) Proteinase-activated receptor-2-mediated activation of stress-activated protein kinases and inhibitory kappa B kinases in NCTC 2544 keratinocytes. *J. Biol. Chem.*, **276**, 31657-31666.
- Karp G. (1996) Bioenergetics. In: Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments, 2nd Edn., John Wiley & Sons Inc., New York, 91-103.
- Karplus M. (1959) Contact electron-spin coupling of nuclear magnetic moments. *J. Chem. Phys.*, **30**, 11-15.
- Kassell B. (1970) Proteolytic Enzymes. In: Perlmann C. E. & Lorand L. (Eds.) Methods in Enzymology, Vol. 19, Academic Press, New York / London, 844-852
- Kato A., Fukai K., Oiso N., Hosomi N., Murakami T. & Ishii M. (2003) Association of SPINK5 gene polymorphisms with atopic dermatitis in the Japanese population. *Br. J. Dermatol.*, **148**, 665-669.
- Katunuma N. & Kido H. (1990) Recent advances in research on tryptases and endogenous tryptase inhibitors. *Monogr. Allergy.*, **27**, 51-66.
- Kawamoto S., Mizuguchi Y., Morimoto K., *et al.* (1999) Cloning and expression of Der f6, a serine protease allergen from the house dust mite, *Dermatophagoides farinae*. *Biochem. Biophys. Acta (Netherlands)*, **1454**, 201-207.
- Kawamoto S., Suzuki T., Aki T., Katsutani T., Tsuboi S., Shigeta S. & Ono K. (2002) Der f 16: a novel gelsolin-related molecule identified as an allergen from the house dust mite, *Dermatophagoides farinae*. *FEBS Lett.*, **516**, 234-238.

- Kay L. E., Keifer P. & Saarinen T. (1992) Pure absorption gradient enhanced heteronuclear single quantum correlation spectroscopy with improved sensitivity. *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 10663-10665.
- Kay L. E., Torchia D. A. & Bax A. (1989) Backbone dynamics of proteins as studied by ^{15}N inverse detected heteronuclear NMR spectroscopy: Application to staphylococcal nuclease. *Biochemistry*, **28**, 8972-8979.
- Kazal L. A., Spicer D. S. & Brahinsky R. A. (1948) Isolation of a crystalline trypsin inhibitor-anticoagulant protein from the pancreas. *J. Am. Chem. Soc.*, **70**, 304-340.
- Kezdy F. J., Lorand L. & Miller K. D. (1965) Titration of active centers in Thrombin solutions. Standardization of the enzyme. *Biochemistry*, **4**, 2302-8.
- Khan A. R. & James M. N. (1998) Molecular mechanisms for the conversion of zymogens to active proteolytic enzymes. *Protein Sci.*, **7**, 815-836.
- Kido H., Murakami M., Oba K., Chen Y. & Towatari T. (1999) Cellular proteinases trigger the infectivity of the influenza A and Sendai viruses. *Mol. Cells.*, **9**, 235-244.
- Kim Y. H., Choi J. G., Lee G. M. & Kang K. W. (2001) Domain and genomic sequence analysis of bdellin-KL, a leech-derived trypsin-plasmin inhibitor. *J. Biochem. (Tokyo)*, **130**, 431-438.
- Kim Y. H., Hong S. J., Kim D. R., Kim S. I., Ha K. S., & Kang K. W. (1996) A new trypsin inhibitor from *Hirudo nipponia*. *Mol. Cells*, **6**, 571-576
- Kirkpatrick S., Gelatt Jr. C. D. & Vecchi M. P. (1983) Optimization by Simulated Annealing, *Science*, **220**, 671-680.
- Klaus W., Broger C., Gerber P. & Senn H. (1993) Determination of the Disulphide Bonding Pattern in Proteins by Local and Global Analysis of Nuclear Magnetic Resonance Data: Application to Flavoridin. *J. Mol. Biol.*, **232**, 897-906.
- Klaus W., Schomburg D. (1993) Solution structure of a variant of human pancreatic secretory trypsin inhibitor determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Mol. Biol.*, **229**, 695-706.
- Kobayashi H., Suzuki M., Kanayama N. & Terao T. (2004) A soybean Kunitz trypsin inhibitor suppresses ovarian cancer cell invasion by blocking urokinase upregulation. *Clin. Exp. Metastasis*, **21**, 159-166.
- Komatsu N., Takata M., Otsuki N., Ohka R., Amano O., Takehara K. & Saijoh K. (2002) Elevated stratum corneum hydrolytic activity in Netherton syndrome suggests an inhibitory regulation of desquamation by SPINK5-derived peptides. *J. Invest. Dermatol.*, **118**, 436-443.
- Komatsu N., Takata M., Otsuki N., Toyama T., Ohka R., Takehara K., Saijoh K. (2003) Ex-

- pression and Localization of Tissue Kallikrein mRNAs in Human Epidermis and Appendages. *J. Invest. Dermatol.*, **121**, 542-549.
- Koradi R., Billeter M. & Wüthrich K. (1996) MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *J. Mol. Graph.*, **14**, 51-55.
- Korsinczky M. L., Schirra H. J., Rosengren K. J., West J., Condie B. A., Otvos L., Anderson M. A. & Craik D. J. (2001) Solution structures by 1H NMR of the novel cyclic trypsin inhibitor SFTI-1 from sunflower seeds and an acyclic permutant. *J. Mol. Biol.*, **311**, 579-591.
- Kraulis J., Clore G. M., Nilges M., Jones T. A., Pettersson G., Knowles J. & Gronenborn A. M. (1989) Determination of the three-dimensional solution structure of the C-terminal domain of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. A study using nuclear magnetic resonance and hybrid distance geometry-dynamical simulated annealing. *Biochemistry*, **28**, 7241-7257.
- Kreutzmann P., Schulz A., Ständker L., Forssmann W. G. & Magert H. J. (2004) Recombinant production, purification and biochemical characterization of domain 6 of LEKTI: a temporary Kazal-type-related serine proteinase inhibitor. *J. Chromatogr. B*, **803**, 75-81.
- Krezel A. M., Darba P., Robertson A. D., Fejzo J., Macura S. & Markley J. L. (1994) Solution structure of turkey ovomucoid third domain as determined from nuclear magnetic resonance data. *J. Mol. Biol.*, **242**, 203-214.
- Krissinel E. & Henrick K. (2003) Protein structure comparison in 3D based on secondary structure matching (SSM) followed by C α alignment, scored by a new structural similarity function. In: Kungl A. J. & Kungl P. J. (Eds.) Proceedings of the 5th International Conference on Molecular Structural Biology, Wien (03.-07.09. 2003), 88.
- Krokoszynska I. & Otlewski J. (1996) Thermodynamic stability effects of single peptide bond hydrolysis in protein inhibitors of serine proteinases. *J. Mol. Biol.*, **256**, 793-802.
- Krol J., Kopitz C., Kirschenhofer A., Schmitt M., Magdolen U., Kruger A. & Magdolen V. (2003) Inhibition of intraperitoneal tumor growth of human ovarian cancer cells by bi- and trifunctional inhibitors of tumor-associated proteolytic systems. *Biol. Chem.*, **384**, 1097-1102.
- Krowarsch D., Cierpicki T., Jelen F. & Otlewski J. (2003) Canonical protein inhibitors of serine proteases. *Cell. Mol. Life Sci.*, **60**, 2427-2444.
- Kuboniwa H., Grzesiek S., Delaglio F. & Bax A. (1994) Measurement of HN-H alpha J couplings in calcium-free calmodulin using new 2D and 3D water-flip-back methods. *J. Biomol. NMR*, **4**, 871-878.
- Kumar A., Wagner G., Ernst R. R. & Wüthrich K. (1981) Buildup rates of the nuclear Overhauser effect measured by two-dimensional proton magnetic resonance spectroscopy: impli-

- cations for studies of protein conformation. *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 3654-3658.
- Kuszewski J. & Clore G. M. (2000) Sources of and Solutions to Problems in the Refinement of Protein NMR Structures against Torsion Angle Potentials of Mean Force. *J. Magn. Reson.*, **146**, 249-254.
- Kuszewski J., Gronenborn A. M. & Clore G. M. (1996) Improving the quality of NMR and crystallographic protein structures by means of a conformational database potential derived from structure databases, *Protein Sci.*, **5**, 1067-1080.
- La Rosa E. T., Stern A. S. & Hoch J. C. (1996) Vince. Cambridge, Rowland NMR Toolkit. Rowland Institute for Science.
- Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Laskowski M. Jr. & Kato I. (1980) Protein inhibitors of proteinases. *Annu. Rev. Biochem.*, **49**, 593-626.
- Laskowski M. Jr. & Qasim M. A. (2000) What can the structures of enzyme-inhibitor complexes tell us about the structures of enzyme substrate complexes?. *Biochim. Biophys. Acta*, **1477(1-2)**, 324-37
- Laskowski M. Jr. (2002) Occurrence of Residues in the P6-P3' Region in Different Inhibitor Families. in: <http://www.chem.purdue.edu/LASKOWSKI/qtable.html>.
- Laskowski M. Jr., Qasim M. A. & Lu S. M. (2000) Interaction of standard mechanism, canonical protein inhibitors with serine proteinases, In: Kleanthous C. (Ed.) Protein-protein recognition: The Frontiers in Molecular Biology Series, Oxford University Press, Oxford, 228-279.
- Laskowski R. A. (2001) PDBsum: summaries and analyses of PDB structures. *Nucleic Acids Res.*, **29**, 221-222.
- Laskowski R. A., Hutchinson E. G., Michie A. D., Wallace A. C., Jones M. L. & Thornton J. M. (1997) PDBsum: A Web-based database of summaries and analyses of all PDB structures. *Trends Biochem. Sci.*, **22**, 488-490.
- Laskowski R. A., MacArthur M. W., Moss D. S. & Thornton J. M. (1993) PROCHECK: A program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.*, **26**, 283-291.
- Laskowski R. A., Rullmann J. A., MacArthur M. W., Kaptein R. & Thornton J. M. (1996) AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *J. Biomol. NMR*, **8**, 477-486.
- Lauber T., Marx U. C., Schulz A., Kreutzmann P., Rösch P. & Hoffmann S. (2001) Accurate

- disulfide formation in *Escherichia coli*: overexpression and characterization of the first domain (HF6478) of the multiple Kazal-type inhibitor LEKTI, *Protein Expr. Purif.*, **22**, 108-112.
- Lauber T., Schulz A., Schweimer K., Adermann K. & Marx U. C. (2003) Homologous Proteins with Different Folds: The Three-Dimensional Structures of Domains 1 and 6 of the Multiple Kazal-Type Inhibitor LEKTI. *J. Mol. Biol.*, **328**, 205-219.
- LaVallie E. R., DiBlasio E. A., Kovacic S., Grant K. L., Schendel P. F. & McCoy J. M. (1993) A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. *Biotechnology (N.Y.)*, **11**, 187-193.
- Layne S. P., Merges M. J., Dembo M., Spouge J. L., Conley S. R., Moore J. P., Raina J. L., Renz H., Gelderblom H. R., & Nara P. L. (1992) Factors underlying spontaneous inactivation and susceptibility to neutralization of human immunodeficiency virus, *Virology*, **189**, 695-714.
- Lehesjoki A. E. (2003) Molecular background of progressive myoclonus epilepsy. *EMBO J.*, **22**, 3473-3478.
- Lehmann K., Schweimer K., Neudecker P. & Rösch P. (2004) Sequence-specific ¹H, ¹³C and ¹⁵N resonance assignments of Ara h 6, an allergenic 2S albumin from peanut. *J. Biomol. NMR*, **29**, 93-94.
- Liepinsh E., Berndt K. D., Sillard R., Mutt V. & Otting, G. (1994) Solution structure and dynamics of PEC-60, a protein of the Kazal type inhibitor family, determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Mol. Biol.*, **239**, 137-153.
- Logeat F., Bessia C., Brou C., LeBail O., Jarriault S., Seidah N. G. & Israel A. (1998) The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 8108-12.
- Lomas D. A. & Parfrey H. (2004) alpha(1)-Antitrypsin deficiency * 4: Molecular pathophysiology. *Thorax*, **59**, 529-535.
- Lomas D. A., Loubakos A., Cumming S. A. & Belorgey D. (2002) Hypersensitive mouse-traps, alpha1-antitrypsin deficiency and dementia. *Biochem. Soc. Trans.*, **30**, 89-92.
- Lu W., Apostol I., Qasim M. A., Warne N., Wynn R., Zhang W. L., Anderson S., Chiang Y. W., Ogin E., Rothberg I., Ryan K. & Laskowski M. Jr. (1997) Binding of amino acid side-chains to S1 cavities of serine proteinases. *J. Mol. Biol.*, **266**, 441-461.
- Luscombe N. M., Laskowski R. A., Westhead D. R., Milburn D., Jones S., Karmirantzou M. & Thornton J. M. (1998) New tools and resources for analysing protein structures and their interactions. *Acta Cryst.*, **D54**, 1132-1138.
- Macfarlane S. R., Seatter M. J., Kanke T., Hunter G. D. & Plevin R. Proteinase-activated re-

- ceptors. *Pharmacol. Rev.*, **53**, 245-282.
- Mägert H. J., Kreutzmann P., Drögemüller K., Ständker L., Adermann K., Walden M., John H., Korting H. C. & Forssmann W. G. (2002 a) The 15-domain serine proteinase inhibitor LEKTI biochemical properties, genomic organization, and pathophysiological role. *Eur. J. Med. Res.*, **7**, 49-56.
- Mägert H. J., Kreutzmann P., Ständker L., Walden M., Drögemüller K. & Forssmann W. G. (2002 b) LEKTI a multidomain serine proteinase inhibitor with pathophysiological relevance. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **34**, 573-576.
- Mägert H. J., Ständker L., Kreutzmann P., Zucht H. D., Reinecke M., Sommerhoff C. P., Fritz H. & Forssmann W. G. (1999) LEKTI, a novel 15-domain type of human serine proteinase inhibitor. *J. Biol. Chem.*, **274**, 21499-21502.
- Marion D., Ikura M., Tschudin R. & Bax A. (1989) Rapid recording of 2D NMR spectra without phase cycling. Applications to the study of hydrogen exchange in proteins. *J. Magn. Reson.*, **85**, 393-399.
- Markley J. L., Bax A., Arata Y., Hilbers C. W., Kaptein R., Sykes B. D., Wright P. E. & Wüthrich K. (1998) Recommendations for the Presentation of NMR Structures of Proteins and Nucleic Acids. *Pure Appl. Chem.*, **70**, 117-142.
- Marx U. C., Korsinczky M. L., Schirra H. J., Jones A., Condie B., Otvos L. Jr. & Craik D. J. (2003) Enzymatic cyclization of a potent bowman-birk protease inhibitor, sunflower trypsin inhibitor-1, and solution structure of an acyclic precursor peptide. *J. Biol. Chem.*, **278**, 21782-21789.
- McKay T. R., Bell S., Tenev T., Stoll V., Lopes R., Lemoine N. R. & McNeish I. A. (2003) Procaspase 3 expression in ovarian carcinoma cells increases survivin transcription which can be countered with a dominant-negative mutant, survivin T34A; a combination gene therapy strategy. *Oncogene*, **22**, 3539-3547.
- McKeating J. A. & Moore J. P. (1991) HIV infectivity, *Nature*, **349**, 660.
- McPhalen C. A. & James M. N. (1988) Structural comparison of two serine proteinase-protein inhibitor complexes: eglin-c-subtilisin Carlsberg and CI-2-subtilisin Novo. *Biochemistry*, **27**, 6582-6598.
- Menegatti E., Salvadori S., Guarneri M. & Scatturin A. (1983) Trypsin-pancreatic secretory isoinhibitor A from bovine pancreas (Kazal type). Spectroscopic study on structure and stability. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **21**, 562-567.
- Menegatti E., Tomatis R., Guarneri M. & Scatturin A. (1981) Conformational stability of porcine-pancreatic secretory trypsin inhibitors (Kazal inhibitors). *Int. J. Pept. Protein Res.*, **17**, 454-459.

- Meyer O. & Schlegel H. G. (1983) Biology of aerobic carbon monoxide-oxidizing bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, **37**, 227-310.
- Michaelis I. & Menten M. L. (1913) Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem Z.*, **49**, 333-369.
- Miedzobrodzki J., Kaszycki P., Bialecka A. & Kasprawicz A. (2002) Proteolytic activity of *Staphylococcus aureus* strains isolated from the colonized skin of patients with acute-phase atopic dermatitis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **21**, 269-276.
- Mitraki A. & King J. (1989) Protein folding intermediates and inclusion body formation. *Bio-technology*, **7**, 690-697.
- Mitsudo K., Jayakumar A., Henderson Y., Frederick M. J., Kang Y., Wang M., El-Naggar A. K. & Clayman G. L. (2003) Inhibition of Serine Proteinases Plasmin, Trypsin, Subtilisin A, Cathepsin G, and Elastase by LEKTI: A Kinetic Analysis, *Biochemistry*, **42**, 3874-3881.
- Moffatt M. F. (2004) SPINK5: a gene for atopic dermatitis and asthma. *Clin. Exp. Allergy*, **34**, 325-327.
- Molnar A. & Georgopoulos K. (1994) The Ikaros gene encodes a family of functionally diverse zinc finger DNA-binding proteins. *Mol. Cell Biol.*, **14**, 8292-8303.
- Mori S., Abeygunawardana C., Johnson M. O. & Vanzijl P. C. M. (1995) Improved Sensitivity of HSQC Spectra of Exchanging Protons at Short Interscan Delays Using a New Fast HSQC (FHSQC) Detection Scheme That Avoids Water Saturation. *J. Magn. Reson. B*, **108**, 94-98.
- Morrison J. F. (1969) Kinetics of the reversible inhibition of enzyme-catalysed reactions by tight binding inhibitors. *Biochem. Biophys. Acta*, **185**, 269-286.
- Morrison J. F. (1982) The slow tight-binding inhibition of enzyme-catalyzed reactions. *Trends Biochem. Sci.*, **7**, 102-105.
- Moses E. & Hinz H. J. (1983) Basic pancreatic trypsin inhibitor has unusual thermodynamic stability parameters. *J. Mol. Biol.*, **170**, 765-776.
- Mühlhahn P., Czisch M., Morenweiser R., Habermann B., Engh R. A., Sommerhoff C. P., Auerswald E. A. & Holak T. A. (1994) Structure of leech derived tryptase inhibitor (LDTI-C) in solution, *FEBS Lett.*, **355**, 290-296.
- Murzin A., Brenner S. E., Hubbard T. J. P. & Chothia C. (1995) SCOP: a Structural Classification of Proteins database for the investigation of sequences and structures. *J. Mol. Biol.*, **247**, 536-540.
- Musil D., Bode W., Huber R., Laskowski M. Jr., Lin T. Y. & Ardelt W. (1991) Refined X-ray crystal structures of the reactive site modified ovomucoid inhibitor third domains from sil-

- ver pheasant (OMSVP3*) and from Japanese quail (OMJPQ3*). *J. Mol. Biol.*, **220**, 739-755.
- Nakayama K. (1997) Furin: a mammalian subtilisin/Kex2p-like endoprotease involved in processing of a wide variety of precursor proteins. *Biochem J.*, **327**, 625-635.
- NC-IUBMB: Enzyme Nomenclature (1992) Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes, NC-IUBMB. Academic Press, New York, NY.
- Netherton E. W. (1958) A unique case of trichorrhhexis nodosa; bamboo hairs. *AMA Arch. Derm.*, **78**, 483-487.
- Neudecker P., Sticht H. & Rösch P. (2001) Improving the efficiency of the Gaussian conformational database potential for the refinement of protein and nucleic acid structures, *J. Biomol. NMR*, **21**, 373-375.
- Neurath H. (1984) Evolution of proteolytic enzymes. *Science*, **224**, 350-357.
- Neurath H. (1989) Proteolytic processing and physiological regulation. *Trends Biochem. Sci.*, **14**, 268-271.
- Nielsen K. J., Heath R. L., Anderson M. A. & Craik D. J. (1994) The three-dimensional solution structure by ¹H NMR of a 6-kDa proteinase inhibitor isolated from the stigma of *Nicotiana glauca*. *J. Mol. Biol.*, **242**, 231-243.
- Nilges M. (1996) Structure calculation from NMR data, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **6**, 617-623.
- Nilges M., Clore G. M. & Gronenborn A. M. (1988 b) Determination of three-dimensional structures of proteins from interproton distance data by dynamical simulated annealing from a random array of atoms, *FEBS Lett.*, **239**, 129-136.
- Nilges M., Gronenborn A. M., Brünger A. T. & Clore G. M. (1988 a) Determination of three-dimensional structures of proteins by simulated annealing with interproton distance restraints. Application to crambin, potato carboxypeptidase inhibitor and barley serine proteinase inhibitor 2, *Protein. Eng.*, **2**, 27-38.
- Niwa Y., Yano M., Futaki S., Okumura Y. & Kido H. (1996) T-cell membrane-associated serine protease, tryptase TL2, binds human immunodeficiency virus type 1 gp120 and cleaves the third-variable-domain loop of gp120. Neutralizing antibodies of human immunodeficiency virus type 1 inhibit cleavage of gp120. *Eur. J. Biochem.*, **237**, 64-70.
- Notredame C., Higgins D. & Heringa J. (2000) T-Coffee: A novel method for multiple sequence alignments. *J. Mol. Biol.*, **302**, 205-2179.
- Novy R., Berg J., Yaeger K. & Mierendorf R. (1995) pET TRX Fusion System for Increased Solubility of Proteins Expressed in *E. coli*. *in* *Novations*, **3**, 7-9.
- Odorzynski T. W. & Light A. (1979) Refolding of the mixed disulfide of bovine trypsinogen

and glutathione. *J. Biol. Chem.*, **254**, 4291-4295.

Okada Y., Tsuboi S., Tsuda Y., Nakabayashi K., Nagamatsu Y. & Yamamoto J. (1989) Synthesis of peptide fragments related to eglin c and examination of their inhibitory effect on human leukocyte elastase, cathepsin G and alpha-chymotrypsin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **161**, 272-275.

Otlewski J., Jaskolski M., Buczek O., Cierpicki T., Czapinska H., Krowarsch D., Smalas A. O., Stachowiak D., Szpineta A. & Dadlez M. (2001) Structure-function relationship of serine protease-protein inhibitor interaction. *Acta Biochim. Pol.*, **48**, 419-428.

Otlewski J., Krowarsch D. & Apostoluk W. (1999) Protein inhibitors of serine proteinases. *Acta Biochim. Pol.*, **46**, 531-565.

Papamokos E., Weber E., Bode W., Huber R., Empie M. W., Kato I. & Laskowski M. Jr. (1982) Crystallographic refinement of Japanese quail ovomucoid, a Kazal-type inhibitor, and model building studies of complexes with serine proteases. *J. Mol. Biol.*, **158**, 515-537.

Pardi A., Billeter M. & Wüthrich K. (1984) Calibration of the angular dependence of the amide proton - C α proton coupling constants, $^3J_{\text{HNH}\alpha}$, in a globular protein. *J. Mol. Biol.* **180**, 741-751.

Pearnton D. J., Nirunsuksiri W., Rehemtulla A., Lewis S. P., Presland R. B. & Dale B. A. (2001) Proprotein convertase expression and localization in epidermis: evidence for multiple roles and substrates. *Exp. Dermatol.*, **10**, 193-203.

Pereira P. J., Bergner A., Macedo-Ribeiro S., Huber R., Matschiner G., Fritz H., Sommerhoff C. P. & Bode W. (1998) Human beta-tryptase is a ring-like tetramer with active sites facing a central pore. *Nature*, **392**, 306-311.

Petraki C. D., Karavana V. N., Skoufogiannis P. T., Little S. P., Howarth D. J., Yousef G. M. & Diamandis E. P. (2001) The spectrum of human kallikrein 6 (zyme/protease M/neurosin) expression in human tissues as assessed by immunohistochemistry. *J. Histochem. Cytochem.*, **49**, 1431-1441.

Porath J. (1992) Immobilized metal ion affinity chromatography. *Protein Expr.Purif.*, **3**, 263-281.

Powell M. J. D. (1977) Restart procedures for the conjugate gradient method, *Mathemat. Progr.*, **12**, 241-254.

Prinz W. A., Aslund F., Holmgren A. & Beckwith J. (1997) The role of the thioredoxin and glutaredoxin pathways in reducing protein disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *J.Biol.Chem.*, **272**, 15661-15667.

Ramachandran G. N. & Sasisekharan V. (1968) Conformation of polypeptides and proteins, *Adv. Protein. Chem.*, **23**, 283-438.

- Ramachandran G. N., Ramakrishnan C. & Sasisekharan V. (1963) Stereochemistry of polypeptide chain configurations, *J. Mol. Biol.*, **7**, 95-99.
- Rawlings N. D. & Barrett A. J. (1999) MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Research*, **27**, 325-331.
- Rawlings N. D., Tolle D. P. & Barrett A. J. (2004 a) Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochem. J.*, **378**, 705-716.
- Rawlings N. D., Tolle D. P. & Barrett A. J. (2004 b) MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.*, **32**, D160-164.
- Rehm T., Huber R. & Holak T. A. (2002) Application of NMR in structural proteomics: screening for proteins amenable to structural analysis. *Structure (Camb.)*, **10**, 1613-1618.
- Rice K. D., Tanaka R. D., Katz B. A., Numerof R. P. & Moore W. R. (1998) Inhibitors of tryptase for the treatment of mast cell-mediated diseases. *Curr. Pharm. Res.*, **4**, 381-396.
- Ritchie B. C. (2003) Protease inhibitors in the treatment of hereditary angioedema. *Transfus. Apheresis. Sci.*, **29**, 259-267.
- Robertson A. D., Westler W. M. & Markley J. L. (1988) Two-dimensional NMR studies of Kazal proteinase inhibitors. 1. Sequence-specific assignments and secondary structure of turkey ovomucoid third domain. *Biochemistry*, **27**, 2519-2529.
- Rydel T. J., Ravichandran K. G., Tulinsky A., Bode W., Huber R., Roitsch C. & Fenton J. W. 2nd (1990) The structure of a complex of recombinant hirudin and human alpha-thrombin. *Science*, **249**, 277-280.
- Rydel T. J., Tulinsky A., Bode W. & Huber R. (1991) Refined structure of the hirudin-thrombin complex. *J. Mol. Biol.*, **221**, 583-601.
- Saiki R. K., Scharf S., Faloona F., Mullis K. B., Horn G. T., Erlich H. A. & Arnheim N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, **230**, 1350-1354.
- Sallenave J. M. (2002) Antimicrobial activity of antiproteinases. *Biochem. Soc. Trans.*, **30**, 111-115.
- Samac D. A. & Smigocki A. C. (2003) Expression of oryzacystatin I and II in alfalfa increases resistance to the root-lesion nematode. *Phytopathology*, **93**, 799-804.
- Sambrook J., Fritsch E. F. & Maniatis T. (1989) Molecular Cloning. A Laboratory Manual., 2nd Edn., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Press, New York.
- Sasaki T., Hohenester E., Göhring W. & Timpl R. (1998) Crystal structure and mapping by site-directed mutagenesis of the collagen-binding epitope of an activated form of BM-40/SPARC/osteonectin. *EMBO J.*, **17**, 1625-1634.

- Sattar R., Ali S. A. & Abbasi A. (2003) Bioinformatics of granzymes: sequence comparison and structural studies on granzyme family by homology modeling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **308**, 726-735.
- Sattler M., Schwendinger M. G., Schleucher J. & Griesinger C. (1995) Novel strategies for the sensitivity enhancement in heteronuclear multidimensional NMR experiments employing pulsed field gradients. *J. Biomol. NMR*, **5**, 11-22.
- Sayle R. (1995) RasMol V2.6 molecular visualisation programme. Glaxo Wellcome Research and Development, Stevenage, Hertfordshire, UK.
- Schägger H. & von Jagow G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100kDa. *Anal. Biochem.*, **166**, 368-379.
- Schechter I. & Berger A. (1967) On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **27**, 157-162.
- Schechter N. M., Brass L. F., Lavker R. M. & Jensen P. J. (1998) Reaction of mast cell proteases tryptase and chymase with protease activated receptors (PARs) on keratinocytes and fibroblasts. *J. Cell Physiol.*, **176**, 365-373.
- Schellenberger V., Braune K., Hofmann H. J. & Jakubke H. D. (1991) The specificity of chymotrypsin. A statistical analysis of hydrolysis data. *Eur. J. Biochem.*, **199**, 623-636.
- Schirra H. J., Scanlon M. J., Lee M. C., Anderson M. A. & Craik D. J. (2001) The solution structure of C1-T1, a two-domain proteinase inhibitor derived from a circular precursor protein from *Nicotiana glauca*. *J. Mol. Biol.*, **306**, 69-79.
- Schleucher J., Schwendinger M. G., Sattler M., Schmidt P., Schedletzky O., Glaser S. J., Sørensen O. W. & Griesinger C. (1994) A general enhancement scheme in heteronuclear multidimensional NMR employing pulsed field gradients. *J. Biomol. NMR*, **4**, 301-306.
- Schlott B., Wöhnert J., Icke C., Hartmann M., Ramachandran R., Gührs K. H., Glusa E., Flemming J., Görlach M., Grosse F. & Ohlenschläger O. (2002) Interaction of Kazal-type inhibitor domains with serine proteinases: biochemical and structural studies, *J. Mol. Biol.*, **318**, 533-546.
- Schmid F. X. (1989) Spectral methods of characterizing protein conformation and conformational changes. in: Creighton T. E (Ed.), *Protein Structure: a Practical Approach*, IRL Press, Oxford, 251-285.
- Schomburg I., Chang A., Ebeling C., Gremse M., Heldt C., Huhn G. & Schomburg D. (2004) BRENDA, the enzyme database: updates and major new developments. *Nucleic Acids Res.*, **32**, 431-433.
- Schomburg I., Hofmann O., Bösche C., Chang A. & Schomburg D. (2000) Enzyme data and

- metabolic information: BRENDA, a resource for research in biology, biochemistry, and medicine. *Gene Funct. Dis.*, **3-4**, 109-118.
- Schulz A. (2000) Differentielle Struktur-Aktivitätsrelation der Guanylatzyklase-C aktivierenden Peptidhormone Guanylin und Uroguanylin. Dissertation, Universität Hannover.
- Schwarz H., Hinz H. J., Mehlich A., Tschesche H. & Wenzel H. R. (1987) Stability studies on derivatives of the bovine pancreatic trypsin inhibitor. *Biochemistry*, **26**, 3544-3551.
- Schweimer K. (2000) Mehrdimensionale heteronukleare NMR Spektroskopie zur Bestimmung der Strukturen des Birkenpollenallergens Bet v 1, des *Guillardia theta* Rubredoxins und des [2Fe-2S] Ferredoxins aus *Haliobacterium salinarum*.. Dissertation, Universität Bayreuth.
- Schwieters C. D., Kuszewski J. J., Tjandra N. & Clore G. M. (2003) The Xplor-NIH NMR molecular structure determination package. *J. Magn. Reson.*, **160**, 65-73.
- Scott M. J., Huckaby C. S., Kato I., Kohr W. J., Laskowski M. Jr., Tsai M. J. & O'Malley B. W. (1987) Ovoinhibitor introns specify functional domains as in the related and linked ovomucoid gene. *J. Biol. Chem.*, **262**, 5899-5907.
- Seidah N. G. & Chrétien M. (1992) Proprotein and prohormone convertases of the subtilisin family: recent developments and future perspectives. *Trends Endocrinol. Metab.*, **3**, 133-140.
- Seife C. (1997) Blunting nature's Swiss army knife. *Science*, **277**, 1602-1603.
- Shaka A. J., Keeler J., Frenkiel T. & Freeman R. (1983) An Improved Sequence for Broadband Decoupling: WALTZ-16. *J. Magn. Reson.*, **52**, 335-338.
- Shaka A., Barker P. B. & Freeman R. (1985) Computer-optimized decoupling scheme for wideband applications and low-level operation. *J. Magn. Reson.*, **64**, 547-552.
- Shaw G. L., Davis B., Keeler J. & Fersht A. R. (1995) Backbone dynamics of chymotrypsin inhibitor 2: effect of breaking the active site bond and its implications for the mechanism of inhibition of serine proteases. *Biochemistry*, **34**, 2225-2233.
- Sibanda B. L., Blundell T. L. & Thornton J. M. (1989) Conformation of beta-hairpins in protein structures. A systematic classification with applications to modelling by homology, electron density fitting and protein engineering. *J. Mol. Biol.*, **206**, 759-777.
- Simon M., Jonca N., Guerrin M., Haftek M., Bernard D., Caubet C., Egelrud T., Schmidt R. & Serre G. (2001) Refined characterization of corneodesmosin proteolysis during terminal differentiation of human epidermis and its relationship to desquamation. *J. Biol. Chem.*, **276**, 20292-20299.
- Sippl M. J. (1993) Boltzmann's principle, knowledge-based mean fields and protein folding.

- An approach to the computational determination of protein structures, *J. Comput. Aided Mol. Des.*, **7**, 473-501.
- Sklenar V., Piotto M., Leppik R. & Saudek V. (1993) Gradient-Tailored Water Suppression for ^1H - ^{15}N HSQC Experiments Optimized to Retain Full Sensitivity. *J. Magn. Reson. A*, **102**, 241-245.
- Smith P. K., Krohn R. I., Hermanson G. T., Mallia A. K., Gartner F. H., Provenzano M. D., Fujimoto E. K., Goeke N. M., Olson B. J. & Klenk D. C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, **150**, 76-85.
- Sommerhoff C. P., Bode W., Matschiner G., Bergner A. & Fritz H. (2000) The human mast cell tryptase tetramer: a fascinating riddle solved by structure. *Biochim. Biophys. Acta*, **1477**, 75-89.
- Sommerhoff C. P., Sollner C., Mentele R., Piechottka G. P., Auerswald E. A. & Fritz H. (1994) A Kazal-type inhibitor of human mast cell tryptase: isolation from the medical leech *Hirudo medicinalis*, characterization, and sequence analysis. *Biol. Chem. Hoppe Seyler*, **375**, 685-694.
- Song J. & Markley J. L. (2001) NMR chemical shift mapping of the binding site of a protein proteinase inhibitor: changes in the ^1H , ^{13}C and ^{15}N NMR chemical shifts of turkey ovomucoid third domain upon binding to bovine chymotrypsin A_α . *J. Mol. Recognit.*, **14**, 166-171.
- Song J. & Markley J. L. (2003) Protein inhibitors of serine proteinases: role of backbone structure and dynamics in controlling the hydrolysis constant. *Biochemistry*, **42**, 5186-5194.
- Song J., Laskowski M. Jr., Qasim M. A. & Markley J. L. (2003) Two Conformational States of Turkey Ovomucoid Third Domain at Low pH: Three-Dimensional Structures, Internal Dynamics, and Interconversion Kinetics and Thermodynamics. *Biochemistry*, **42**, 6380-6391.
- Sreerama N., Manning M. C., Powers M. E., Zhang J. X., Goldenberg D. P. & Woody R. W. (1999) Tyrosine, phenylalanine, and disulfide contributions to the circular dichroism of proteins: circular dichroism spectra of wild-type and mutant bovine pancreatic trypsin inhibitor. *Biochemistry*, **38**, 10814-10822.
- Sreerama N., Venyaminov S.Y. & Woody R.W. (2001) Analysis of protein circular dichroism spectra based on the tertiary structure classification. *Anal Biochem.*, **299**, 271-274.
- Sreerama, N. & Woody, R. W. (1993) A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism. *Anal. Biochem.*, **209**, 32-44.
- States D. J., Haberkorn R. A., & Ruben D. J. (1982) A Two-Dimensional Nuclear Overhauser Experiment with Pure Absorption Phase in Four Quadrants. *J. Magn. Reson.*, **48**, 286-292.
- Stewart E. J., Aslund F. & Beckwith J. (1998) Disulfide bond formation in the *Escherichia*

- coli* cytoplasm: an *in vivo* role reversal for the thioredoxins. *EMBO J.*, **17**, 5543-5550.
- Sticht H. (1995) Vom NMR-Spektrum zur dreidimensionalen Struktur von Proteinen: Die Strukturbestimmung des menschlichen Amyloids A4, des Ferredoxins aus *Thermotoga maritima* und des Chemokins Chi1. Dissertation, Universität Bayreuth.
- Stubbs M. T. & Bode W. (1995) The clot thickens: clues provided by thrombin structure. *Trends Biochem. Sci.*, **20**, 23-28.
- Stubbs M. T., Morenweiser R., Stürzebecher J., Bauer M., Bode W., Huber R., Piechottka G. P., Matschiner G., Sommerhoff C. P., Fritz H. & Auerswald E. A. (1997) The three-dimensional structure of recombinant leech-derived tryptase inhibitor in complex with trypsin. Implications for the structure of human mast cell tryptase and its inhibition. *J. Biol. Chem.*, **272**, 19931-19937.
- Sun Z. & Yang P. (2004) Role of imbalance between neutrophil elastase and alpha 1-antitrypsin in cancer development and progression. *Lancet Oncol.*, **5**, 182-190.
- Suzuki Y., Koyama J., Moro O., Horii I., Kikuchi K., Tanida M. & Tagami H. (1996) The role of two endogenous proteases of the stratum corneum in degradation of desmoglein-1 and their reduced activity in the skin of ichthyotic patients. *Br. J. Dermatol.*, **134**, 460-464.
- Syrovets T. & Simmet T. (2004) Novel aspects and new roles for the serine protease plasmin. *Cell. Mol. Life Sci.*, **61**, 873-885.
- Takagi T. & Ito N. (1972) Marked change of circular dichroism of L-cystine solution with temperature. *Biochim. Biophys. Acta*, **257**, 1-10.
- Takeuchi T., Harris J. L., Huang W., Yan K. W., Coughlin S. R. & Craik C. S. (2000) Cellular localization of membrane-type serine protease 1 and identification of protease-activated receptor-2 and single-chain urokinase-type plasminogen activator as substrates. *J. Biol. Chem.*, **275**, 26333-26342.
- Takeuchi Y., Satow Y., Nakamura K. T. & Mitsui Y. (1991) Refined crystal structure of the complex of subtilisin BPN' and Streptomyces subtilisin inhibitor at 1.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, **221**, 309-325.
- Talluri S. & Wagner G. (1996) An Optimized 3D NOESY-HSQC. *J. Magn. Reson. B*, **112**, 200-205.
- Telang M., Srinivasan A., Patankar A., Harsulkar A., Joshi V., Damle A., Deshpande V., Sainani M., Ranjekar P., Gupta G. *et al.* (2003) Bitter gourd proteinase inhibitors: potential growth inhibitors of *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura*. *Phytochemistry*, **63**, 643-652.
- Teles R. C., De Souza E.M., De Calderon L. A. & De Freitas S. M. (2004) Purification and pH stability characterization of a chymotrypsin inhibitor from *Schizolobium parahyba*

- seeds. *Phytochemistry*, **65**, 793-799.
- Thomas M. R. (1994) Simple, effective cleanup of DNA ligation reactions prior to electrotransformation of *E. coli*. *Biotechniques*, **16**, 988-990.
- Thomas W. T., Smith W. A., Hales B. J., Mills K. L. & O'Brien R. M. (2002) Characterization and immunobiology of house dust mite allergens. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **129**, 1-18.
- Thomas W.R. (1993) Mite allergens group I VII. A catalogue of enzymes. *Clin. Exp. Allergy*, **23**, 350-353.
- Tidow H., Lauber T., Vitzithum K., Rösch P., Marx U. C. (2004) Solution Structure of a Chimeric LEKTI-Domain Reveals a Chameleon Sequence. *Biochemistry*, **in press**.
- Trexler M., Bányai L. & Patthy L. (2001) A human protein containing multiple types of protease-inhibitory modules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 3705-3709.
- Trexler M., Bányai L. & Patthy L. (2002) Distinct expression pattern of two related human proteins containing multiple types of protease-inhibitory modules. *Biol. Chem.*, **383**, 223-228.
- Tsunogae Y., Tanaka I., Yamane T., Kikkawa J.-I., Ashida T., Ishikawa C., Watanabe K., Nakamura S. & Takahashi K. (1986) Structure of the trypsin binding domain of Bowman-Birk type protease inhibitor and its interaction with trypsin. *J. Biochem.*, **100**, 1637-1646.
- van de Locht A., Lamba D., Bauer M., Huber R., Friedrich T., Kroger B., Hoffken W. & Bode W. (1995) Two heads are better than one: crystal structure of the insect derived double domain Kazal inhibitor rhodniin in complex with thrombin. *EMBO J.*, **14**, 5149-5157.
- Vanaman T. C. & Bradshaw R. A. (1999) Proteases in cellular regulation minireview series. *J. Biol. Chem.*, **274**, 20047.
- Varani G., Aboul-ela F. & Allain F. H.-T. (1996) NMR investigation of RNA structure. *Prog. Nuc. Magn. Res. Spec.*, **29**, 51-127.
- Venkatachalam C. M. (1968) Stereochemical criteria for polypeptides and proteins V. Conformation of a system of three linked peptide units. *Biopolymers*, **6**, 1425-1436.
- Vergnolle N., Wallace J. L., Bunnett N. W., Hollenberg M. D. (2001) Protease-activated receptors in inflammation, neuronal signaling and pain. *Trends Pharmacol. Sci.*, **22**, 146-152.
- Vriend G. (1990) WHAT IF: A molecular modeling and drug design program, *J. Mol. Graph.*, **8**, 52-56.
- Vuister G. W. & Bax A. (1993) Quantitative J correlation: a new approach for measuring homonuclear three-bound $J(\text{H}^{\text{N}}\text{H}^{\alpha})$ coupling constants in ^{15}N -enriched proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 7772-7777.

- Walkenhorst W. F., Krezel A. M., Rhyu G. I. & Markley J. L. (1994) Solution structure of reactive-site hydrolyzed turkey ovomucoid third domain by nuclear magnetic resonance and distance geometry methods. *J. Mol. Biol.*, **242**, 215-230.
- Walley A. J., Chavanas S., Moffatt M. F., Esnouf R. M., Ubhi B., Lawrence R., Wong K., Abecasis G. R., Jones E. Y., Harper J. I., Hovnanian A. & Cookson W. O. (2001) Gene polymorphism in Netherton and common atopic disease. *Nat. Genet.*, **29**, 175-178.
- Wang L., Qasim M. A., Qasim S. & Laskowski M. Jr. (2003) A Poster on „Gly54 in Turkey Ovomucoid Third Domain. A Highly Conserved, Non-Contact Residue.“, *17th Symposium of the Protein Society* (25.07.-30.07.), Boston, MA.
- Watanabe K. Matsuda T. & Sato Y. (1981) The secondary structure of ovomucoid and its domains as studied by circular dichroism. *Biochim. Biophys. Acta.*, **667**, 242-250.
- Wiechelmann K., Braun R. & Fitzpatrick J. (1988) Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: Identification of the groups responsible for color formation, *Anal Biochem*, **175**, 231-237.
- Wiedow, O., Harder, J., Bartels, J., Streit, V. and Christophers, E. (1998) Antileukoprotease in human skin: an antibiotic peptide constitutively produced by keratinocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **248**, 904-909.
- Wilkins M. R., Gasteiger E., Bairoch A., Sanchez J.-C., Williams K. L., Appel R. D. & Hochstrasser D. F. (1998) Protein Identification and Analysis Tools in the ExPASy Server In: Link A. J. (Ed.) *2-D Proteome Analysis Protocols*, Humana Press, New Jersey.
- Wilkins M. R., Lindskog I., Gasteiger E., Bairoch A., Sanchez J.-C., Hochstrasser D. F. & Appel R. D. (1997) Detailed peptide characterisation using PEPTIDEMASS - a World-Wide Web accessible tool. *Electrophoresis*, **18**, 403-408.
- Williamson M. P., Havel T. F. & Wüthrich K. (1985) Solution conformation of proteinase inhibitor IIA from bull seminal plasma by ¹H nuclear magnetic resonance and distance geometry. *J. Mol. Biol.*, **182**, 295-315.
- Wishart D. S. & Sykes B. D. (1994) The ¹³C Chemical-Shift Index: A simple method for the identification of protein secondary structure using ¹³C chemical-shift data. *J. Biomol. NMR*, **4**, 171-180.
- Wishart D. S., Bigam C. G., Holm A., Hodges R. S. & Sykes B. D. (1995) ¹H, ¹³C and ¹⁵N random coil NMR chemical shifts of the common amino acids. I. Investigations of nearest-neighbor effects. *J. Biomol. NMR*, **5**, 67-81.
- Wishart D. S., Sykes B. D. & Richards F. M. (1991) Relationship between nuclear magnetic resonance chemical shift and protein secondary structure. *J. Mol. Biol.*, **222**, 311-333.
- Wishart D. S., Sykes B. D. & Richards F. M. (1992) The chemical shift index: a fast and

- simple method for the assignment of protein secondary structure through NMR spectroscopy, *Biochemistry*, **31**, 1647-1651.
- Witt H., Luck W., Hennies H. C., Classen M., Kage A., Lass U., Landt O. & Becker M. (2000) Mutations in the gene encoding the serine protease inhibitor, Kazal type 1 are associated with chronic pancreatitis. *Nature Genet.*, **25**, 213-216.
- Woody R. W. (1978) Aromatic side-chain contributions to the far ultraviolet circular dichroism of peptides and proteins. *Biopolymers*, **17**, 1451-1467.
- Woody R. W. (1994) Contributions of tryptophan side chains to the far-ultraviolet circular dichroism of proteins. *Eur. Biophys. J.*, **23**, 253-262.
- Wüthrich K. (1986) NMR of proteins and nucleic acids. John Wiley & Sons, New York.
- Xie Z. W., Luo M. J., Xu W. F. & Chi C. W. (1997) Two reactive site locations and structure-function study of the arrowhead proteinase inhibitors, A and B, using mutagenesis. *Biochemistry*, **36**, 5846-5852
- Yamamoto N., Yang R., Yoshinaka Y., Amari S., Nakano T., Cinatl J., Rabenau H., Doerr H. W., Hunsmann G., Otaka A., Tamamura H., Fujii N. & Yamamoto N. (2004) HIV protease inhibitor nelfinavir inhibits replication of SARS-associated coronavirus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **318**, 719-725.
- Yousef G. M. & Diamandis E. P. (2001) The new human tissue kallikrein gene family: structure, function, and association to disease. *Endocr.Rev.*, **22**, 184-204.
- Zhang O., Kay L. E., Olivier J. P. & Forman-Kay J. D. (1994) Backbone ^1H and ^{15}N resonance assignments of the N-terminal SH3 domain of drk in folded and unfolded states using enhanced-sensitivity pulsed field gradient NMR techniques. *J. Biomol. NMR*, **4**, 845-858.
- Zhang W., Smithgall T. & Gmeiner W. H. (1997) Three-dimensional structure of the Hck SH2 domain in solution. *J. Biomol. NMR*, **10**, 263-272.
- Zhao Q., Chae Y. K. & Markley J. L. (2002) NMR solution structure of ATTp, an Arabidopsis thaliana trypsin inhibitor. *Biochemistry*, **41**, 12284-12296.
- Zhu G. & Bax A. (1990) Improved linear prediction of truncated signals of known phase. *J. Magn. Reson.*, **90**, 405-410.
- Zhu Y. C., Zeng F. & Oppert, B. (2003) Molecular cloning of trypsin-like cDNAs and comparison of proteinase activities in the salivary glands and gut of the tarnished plant bug *Lygus lineolaris* (Heteroptera: Miridae). *Insect Biochem Mol Biol.*, **33**, 889-899.

10 Anhang

10.1 Nukleotidsequenzen

Nachfolgend sind die mittels DNA-Sequenzierung (Kapitel 3.6.5) erhaltenen Nukleotidsequenzen unter Angabe der jeweils verwendeten Restriktionsschnittstellen und der entsprechenden Aminosäuresequenz aufgeführt. Die Aminosäuresequenz der jeweiligen dom15-Variante ist hellgrau, die Erkennungssequenz für die Proteinase Enterokinase bzw. PreScission-Protease ist jeweils dunkelgrau hinterlegt.

10.1.1 Nukleotidsequenz von pET-21a-HisVak15

BamHI
|

```

1  AAGGAGATATACATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTCGCGGATCCCATC 60
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+
   TTCCTCTATATGTATACCGATCGTACTGACCACCTGTCGTTTACCCAGCGCCTAGGGTAG
       G D I H M A S M T G G Q Q M G R G S H H -

61  ATCATCATCATCATGGTATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTCGCGGATCTGT 120
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+
   TAGTAGTAGTAGTACCATACCGATCGTACTGACCACCTGTCGTTTACCCAGCCCTAGACA
       H H H H G M A S M T G G Q Q M G R D L Y -

121  ACGACGATGACGATAAGGATTCTGAGATGTGCAAAGACTACCGAGTATTGCCAGGATAG 180
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+
   TGCTGCTACTGCTATTCCTAAGACTCTACACGTTTCTGATGGCTCATAACGGGTCCTATC
       D D D D K D S E M C K D Y R V L P R I G -

181  GTTATCTTTGTCCAAAGGATTTAAAGCCTGTCTGTGGTGACGATGGCCAAACCTACAACA 240
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+
   CAATAGAAACAGGTTTCCTAAATTTTCGGACAGACACCACTGCTACCGGTTTGGATGTTGT
       Y L C P K D L K P V C G D D G Q T Y N N -

241  ATCCTTGTCATGCTCTGTGCATGAAAACCTGATACGCCAAACAAATACACACATCCGCAGTA 300
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+
   TAGGAACGTACGAGACAGTACTTTTGGACTATGCGGTTTGTGTTATGTGTGTAGGCGTCAT
       P C M L C H E N L I R Q T N T H I R S T -

301  CAGGGAAAGTGTGAGGAGAGCAGCACCCAGGAACACCGCAGCCAGCATGCCCCGTCCTG 360
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+
   GTCCCTTCACACTCCTCTCGTCGTGGGGTCCTTGGTGGCGTCGGTCGTACGGGGGCAGAC

       G K C E E S S T P G T T A A S M P P S D -

                                     KpnI
                                     |
361  ACGAATGATAATAGCTGCAGCTGGTACCATATGGGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTG 420
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+
   TGCTTACTATTATCGACGTCGACCATGGTATACCTTAAGCTCGAGGCAGCTGTTTCAAC
       E * * * L Q L V P Y G N S S S V D K L A -

421  CGGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCAC 452
   -----+-----+-----+-----+-----+
   GCCGGCGTGAGCTCGTGGTGGTGGTGGTGGT
       A A L E H H H H H H H -

```

10.1.2 Nukleotidsequenz von pBlueskript II KS-EK-*dom15*

XbaI
|

```

TGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCTCTAGAG
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
ACATTATGCTGAGTGATATCCCGCTTAACCTCGAGGTGGCGCCACCGCCGGCGAGATCTC
    * Y D S L * G E L E L H R G G G R S R G -

KpnI
|
GTACCGACGACGACGACAAGGATTCTGAGATGTGCAAAGACTACCGAGTATTGCCAGGA
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
CATGGCTGCTGCTGCTGTTCCCTAAGACTCTACACGTTTCTGATGGCTCATAACGGGTCTT
    T D D D D K D S E M C K D Y R V L P R I -

TAGGTTATCTTTGTCCAAAGGATTTAAAGCCTGTCTGTGGTGACGATGGCCAAACCTACA
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
ATCCAATAGAAACAGGTTTCCCTAAATTTCCGACAGACACCACTGCTACCGGTTTGGATGT
    G Y L C P K D L K P V C G D D G Q T Y N -

ACAATCCTTGCATGCTCTGTTCATGAAAACCTGATACGCCAAACAAATACACACATCCGCA
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
TGTTAGGAACGTACGAGACAGTACTTTTGGACTATGCGGTTTGTGTTATGTGTGTAGGCGT
    N P C M L C H E N L I R Q T N T H I R S -

GTACAGGGAAGTGTGAGGAGAGCAGCACCCAGGAACCACCGCAGCCAGCATGCCCCCGT
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
CATGTCCCTTTCACACTCCTCTCGTCTGGGGTCCCTTGGTGGCGTTCGGTCTACGGGGGCA
    T G K C E E S S T P G T T A A S M P P S -

BamHI
|
CTGACGAATAAGGATCCCCCGGGCTGCAGGAATTCGATATCAAGCTTATCGAT
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 353
GACTGCTTATTCCTAGGGGGCCCGACGTCCTTAAGCTATAGTTCGAATAGCTA
    D E * G S P G L Q E F D I K L I D -

```

10.1.3 Nukleotidsequenz von pBlueskript II KS-PreS-*dom15*

XbaI KpnI
| |

```

ATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCTCTAGAGGTAC
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
TATGCTGAGTGATATCCCGCTTAACCTCGAGGTGGCGCCACCGCCGGCGAGATCTCCATG
    Y D S L * G E L E L H R G G G R S R G T -

CCTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCCGATTCTGAGATGTGCAAAGACTACCGAGTATTGCC
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
GGACCTTCAAGACAAGGTCCCCGGGCTAAGACTCTACACGTTTCTGATGGCTCATAACGG
    L E V L F Q G P D S E M C K D Y R V L P -

CAGGATAGGTTATCTTTGTCCAAAGGATTTAAAGCCTGTCTGTGGTGACGATGGCCAAAC
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
GTCCCTATCCAATAGAAACAGGTTTCCCTAAATTTCCGACAGACACCACTGCTACCGGTTTG
    R I G Y L C P K D L K P V C G D D G Q T -

```



```

CTACAACAATCCTTGCATGCTCTGTTCATGAAAACCTGATACGCCAAACAAATACACACAT
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
GATGTTGTTAGGAACGTACGAGACAGTACTTTTGGACTATGCGGTTTGTATTATGTGTGTA
Y N N P C M L C H E N L I R Q T N T H I -
CCGCAGTACAGGGAAGTGTGAGGAGAGCAGCACCCAGGAACCACCGCAGCCAGCATGCC
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
GGCGTCATGTCCCTTCACACTCCTCTCGTCGTGGGGTCCTTGGTGGCGTCGGTTCGTACGG
R S T G K C E E S S T P G T T A A S M P -

          BamHI
          |
CCCGTCTGACGAATAAGGATCCCCCGGGCTGCAGGAATTTCGATATCAAGCTTA
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 353
GGGCAGACTGCTTATTCTAGGGGGCCGACGTCCTTAAGCTATAGTTTCGAAT
P S D E * G S P G L Q E F D I K L -

```

10.1.4 Nukleotidsequenz von pBlueskript II KS-PreS-dom15kurz

```

          KpnI
          |
CTGGGTACCCCTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCCCGATTCTGAGATGTGCAAAGACTACCGA
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
GACCCATGGGACCTTCAAGACAAGGTCCCCGGGCTAAGACTCTACACGTTTCTGATGGCT
L G T L E V L F Q G P D S E M C K D Y R -
GTATTGCCCAGGATAGGTTATCTTTGTCCAAAGGATTTAAAGCCTGTCTGTGGTGACGAT
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
CATAACGGGTCCTATCCAATAGAAACAGGTTTCCTAAATTTTCGGACAGACACCACTGCTA
V L P R I G Y L C P K D L K P V C G D D -
GGCCAAACCTACAACAATCCTTGCATGCTCTGTTCATGAAAACCTGATACGCCAAACAAAT
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
CCGGTTTGGATGTTGTTAGGAACGTACGAGACAGTACTTTTGGACTATGCGGTTTGTTTA
G Q T Y N N P C M L C H E N L I R Q T N -
          BamHI          XbaI
          |          |
ACACACATCCGCAGTACAGGGAAGTGTGAGTAATAAGGATCCACTAGTTCTAGAGCGGCC
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
TGTGTGTAGGCGTCATGTCCCTTCACACTCATTATTCCTAGGTGATCAAGATCTCGCCGG
T H I R S T G K C E * * G S T S S R A A -
GCCACCGCGGTGGAGCTCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACGCGCGCTCACTGGC
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
CGGTGGCGCCACCTCGAGGTTAAGCGGGATATCACTCAGCATAATGCGCGCGAGTGACCG
A T A V E L Q F A L * * V V L R A L T G -
CGTCGTTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAAACCTGGCGTTACCCAACTTAAT
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 352
GCAGCAAAATGTTGCAGCACTGACCCTTTTGGGACCGCAATGGGTGAATTA
R R F T T S * L G K P W R Y P T * -

```

10.1.5 Nukleotidsequenz von pBlueskript II KS-PreS-dom15ldti

KpnI

```

      |
CTGGGTACCCCTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCGATTCTGAGATGTGCGCGTGTCCAAAG
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
GACCCATGGGACCTTCAAGACAAGGTCCTCCCGGGCTAAGACTCTACACGCGCACAGGTTTC
L  G  T  L  E  V  L  F  Q  G  P  D  S  E  M  C  A  C  P  K  -

GATTTAAAGCCTGTCTGTGGTGACGATGGCCAAACCTACAACAATCCTTGCATGCTCTGT
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
CTAAATTTTCGGACAGACACCACCTGCTACCGGTTTGGATGTTGTTAGGAACGTACGAGACA
D  L  K  P  V  C  G  D  D  G  Q  T  Y  N  N  P  C  M  L  C  -

CATGAAAACCTGATACGCCAAACAAATACACATCCGCAGTACAGGGAAGTGTGAGTAA
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
GTACTTTTGGACTATGCGGTTTGTATGTGTGTAGGCGTCATGTCCCTTCACACTCATT
H  E  N  L  I  R  Q  T  N  T  H  I  R  S  T  G  K  C  E  *  -

BamHI      XbaI
|          |
TAAGGATCCACTAGTTCTAGAGCGGCCGCCACCGCGGTGGAGCTCCAATTCGCCCTATAG
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
ATTCCTAGGTGATCAAGATCTCGCCGGCGGTGGCGCCACCTCGAGGTTAAGCGGGATATC
*  G  S  T  S  S  R  A  A  A  T  A  V  E  L  Q  F  A  L  *  -

TGAGTCGTATTACGCGCGCTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCC
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
ACTCAGCATAATGCGCGGAGTGACCGGCAGCAAAATGTTGCAGCACTGACCCTTTTGGG
*  V  V  L  R  A  L  T  G  R  R  F  T  T  S  *  L  G  K  P  -

TGGCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTTCGCCAGCTGG
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 352
ACCGCAATGGGTTGAATTAGCGGAACGTCGTGTAGGGGGAAGCGGTTCGACC
W  R  Y  P  T  *  S  P  C  S  T  S  P  F  R  Q  L  -

```

10.2 Chemische Verschiebungen

10.2.1 Chemische Verschiebungen für GPdom15kurz

Angabe der Verschiebungen wie in der BMRB-Datenbank (<http://www.bmrb.wisc.edu>) unter der Zugriffsnummer 6179 hinterlegt.

1	ASP	H	H	8,60	3	GLU	N	N	122,55
1	ASP	HA	H	4,61	4	MET	H	H	8,10
1	ASP	HB2	H	2,73	4	MET	HA	H	4,15
1	ASP	HB3	H	2,73	4	MET	HB2	H	2,20
1	ASP	N	N	120,80	4	MET	HB3	H	2,20
2	SER	H	H	8,31	4	MET	HG2	H	2,46
2	SER	HA	H	4,33	4	MET	HG3	H	2,60
2	SER	HB2	H	3,91	4	MET	N	N	118,83
2	SER	HB3	H	3,99	5	CYS	H	H	7,98
2	SER	N	N		5	CYS	HA	H	4,90
3	GLU	H	H	8,40	5	CYS	HB2	H	2,94
3	GLU	HA	H	4,31	5	CYS	HB3	H	3,58
3	GLU	HB2	H	2,02	5	CYS	N	N	114,49
3	GLU	HB3	H	2,12	6	LYS	H	H	7,45
3	GLU	HG2	H	2,29	6	LYS	HA	H	4,21
3	GLU	HG3	H	2,33	6	LYS	HB2	H	1,89

6	LYS	HB3	H	1,89	14	ILE	N	N	120,21
6	LYS	HG2	H	1,35	15	GLY	H	H	8,14
6	LYS	HG3	H	1,47	15	GLY	HA2	H	3,56
6	LYS	HD2	H	1,65	15	GLY	HA3	H	4,61
6	LYS	HD3	H	1,65	15	GLY	N	N	108,35
6	LYS	HE2	H	2,93	16	TYR	H	H	9,92
6	LYS	HE3	H	2,93	16	TYR	HA	H	4,82
6	LYS	N	N	119,53	16	TYR	HB2	H	2,68
7	ASP	H	H	8,05	16	TYR	HB3	H	2,97
7	ASP	HA	H	4,50	16	TYR	HD1	H	7,09
7	ASP	HB2	H	1,83	16	TYR	HD2	H	7,09
7	ASP	HB3	H	2,42	16	TYR	HE1	H	6,81
7	ASP	N	N	117,79	16	TYR	HE2	H	6,81
8	TYR	H	H	7,41	16	TYR	N	N	122,73
8	TYR	HA	H	5,04	17	LEU	H	H	8,60
8	TYR	HB2	H	2,98	17	LEU	HA	H	4,55
8	TYR	HB3	H	3,51	17	LEU	HB2	H	1,58
8	TYR	HD1	H	7,19	17	LEU	HB3	H	1,58
8	TYR	HD2	H	7,09	17	LEU	HG	H	1,58
8	TYR	HE1	H	6,82	17	LEU	HD1	H	0,85
8	TYR	HE2	H	6,86	17	LEU	HD2	H	0,85
8	TYR	N	N	119,59	17	LEU	N	N	124,49
9	ARG	H	H	9,20	18	CYS	H	H	8,13
9	ARG	HA	H	4,38	18	CYS	HA	H	5,40
9	ARG	HB2	H	1,88	18	CYS	HB2	H	2,57
9	ARG	HB3	H	1,88	18	CYS	HB3	H	2,90
9	ARG	HG2	H	1,61	18	CYS	N	N	121,47
9	ARG	HG3	H	1,77	19	PRO	HA	H	4,68
9	ARG	HD2	H	3,23	19	PRO	HB2	H	2,09
9	ARG	HD3	H	3,23	19	PRO	HB3	H	2,49
9	ARG	HE	H	7,24	19	PRO	HG2	H	2,29
9	ARG	N	N	123,56	19	PRO	HG3	H	2,29
9	ARG	NE	N		19	PRO	HD2	H	3,39
10	VAL	H	H	8,10	19	PRO	HD3	H	4,03
10	VAL	HA	H	4,17	20	LYS	H	H	8,69
10	VAL	HB	H	1,27	20	LYS	HA	H	4,21
10	VAL	HG1	H	0,56	20	LYS	HB2	H	2,10
10	VAL	HG2	H	0,16	20	LYS	HB3	H	2,10
10	VAL	N	N	122,15	20	LYS	HG2	H	1,42
11	LEU	H	H	8,65	20	LYS	HG3	H	1,42
11	LEU	HA	H	4,91	20	LYS	HD2	H	1,69
11	LEU	HB2	H	1,55	20	LYS	HD3	H	1,69
11	LEU	HB3	H	1,55	20	LYS	HE2	H	3,01
11	LEU	HG	H	1,55	20	LYS	HE3	H	3,01
11	LEU	HD1	H	0,91	20	LYS	N	N	
11	LEU	HD2	H	0,91	21	ASP	H	H	7,57
11	LEU	N	N	129,09	21	ASP	HA	H	4,26
12	PRO	HA	H	4,24	21	ASP	HB2	H	2,42
12	PRO	HB2	H	2,01	21	ASP	HB3	H	2,53
12	PRO	HB3	H	2,35	21	ASP	N	N	117,65
12	PRO	HG2	H	2,14	22	LEU	H	H	8,65
12	PRO	HG3	H	2,14	22	LEU	HA	H	4,53
12	PRO	HD2	H	3,65	22	LEU	HB2	H	1,65
12	PRO	HD3	H	3,91	22	LEU	HB3	H	1,65
13	ARG	H	H	8,79	22	LEU	HG	H	1,65
13	ARG	HA	H	3,82	22	LEU	HD1	H	0,95
13	ARG	HB2	H	2,03	22	LEU	HD2	H	0,95
13	ARG	HB3	H	2,22	22	LEU	N	N	125,17
13	ARG	HG2	H	1,58	23	LYS	H	H	8,89
13	ARG	HG3	H	1,58	23	LYS	HA	H	4,61
13	ARG	HD2	H	3,23	23	LYS	HB2	H	1,91
13	ARG	HD3	H	3,23	23	LYS	HB3	H	1,91
13	ARG	HE	H	7,27	23	LYS	HG2	H	1,40
13	ARG	N	N		23	LYS	HG3	H	1,40
13	ARG	NE	N		23	LYS	HD2	H	1,67
14	ILE	H	H	8,33	23	LYS	HD3	H	1,67
14	ILE	HA	H	4,12	23	LYS	HE2	H	3,04
14	ILE	HB	H	1,71	23	LYS	HE3	H	3,04
14	ILE	HG12	H	1,12	23	LYS	N	N	128,37
14	ILE	HG13	H	1,45	24	PRO	HA	H	4,71
14	ILE	HG2	H	0,87	24	PRO	HB2	H	1,50
14	ILE	HD1	H	0,87	24	PRO	HB3	H	2,08

24	PRO	HG2	H	1,93	35	ASN	ND2	N	113,89
24	PRO	HG3	H	1,93	36	PRO	HA	H	4,02
24	PRO	HD2	H	3,39	36	PRO	HB2	H	2,24
24	PRO	HD3	H	3,63	36	PRO	HB3	H	2,49
25	VAL	H	H	8,53	36	PRO	HG2	H	2,34
25	VAL	HA	H	4,74	36	PRO	HG3	H	2,34
25	VAL	HB	H	2,18	36	PRO	HD2	H	3,92
25	VAL	HG1	H	1,05	36	PRO	HD3	H	4,18
25	VAL	HG2	H	0,67	37	CYS	H	H	7,56
25	VAL	N	N	111,76	37	CYS	HA	H	3,15
26	CYS	H	H	8,86	37	CYS	HB2	H	0,78
26	CYS	HA	H	5,33	37	CYS	HB3	H	2,72
26	CYS	HB2	H	2,71	37	CYS	N	N	115,58
26	CYS	HB3	H	3,12	38	MET	H	H	7,84
26	CYS	N	N	121,82	38	MET	HA	H	4,27
27	GLY	H	H	9,81	38	MET	HB2	H	2,20
27	GLY	HA2	H	4,21	38	MET	HB3	H	2,44
27	GLY	HA3	H	4,76	38	MET	HG2	H	2,68
27	GLY	N	N	116,05	38	MET	HG3	H	2,81
28	ASP	H	H	9,12	38	MET	N	N	118,11
28	ASP	HA	H	4,40	39	LEU	H	H	6,89
28	ASP	HB2	H	2,44	39	LEU	HA	H	3,62
28	ASP	HB3	H	2,99	39	LEU	HB2	H	0,46
28	ASP	N	N	120,71	39	LEU	HB3	H	1,77
29	ASP	H	H	8,34	39	LEU	HG	H	0,92
29	ASP	HA	H	4,52	39	LEU	HD1	H	0,42
29	ASP	HB2	H	2,73	39	LEU	HD2	H	-0,02
29	ASP	HB3	H	3,05	39	LEU	N	N	122,02
29	ASP	N	N	117,26	40	CYS	H	H	7,75
30	GLY	H	H	8,53	40	CYS	HA	H	3,91
30	GLY	HA2	H	3,75	40	CYS	HB2	H	2,03
30	GLY	HA3	H	4,11	40	CYS	HB3	H	3,15
30	GLY	N	N	109,69	40	CYS	N	N	119,02
31	GLN	H	H	7,93	41	HIS	H	H	8,57
31	GLN	HA	H	4,45	41	HIS	HA	H	4,44
31	GLN	HB2	H	1,72	41	HIS	HB2	H	3,11
31	GLN	HB3	H	1,88	41	HIS	HB3	H	3,36
31	GLN	HG2	H	1,95	41	HIS	HD1	H	
31	GLN	HG3	H	2,03	41	HIS	HD2	H	8,36
31	GLN	HE21	H	7,24	41	HIS	HE1	H	7,25
31	GLN	HE22	H	6,78	41	HIS	HE2	H	
31	GLN	N	N	120,12	41	HIS	N	N	120,11
31	GLN	NE2	N	112,75	41	HIS	ND1	N	
32	THR	H	H	8,39	41	HIS	NE2	N	
32	THR	HA	H	4,94	42	GLU	H	H	8,24
32	THR	HB	H	3,93	42	GLU	HA	H	4,08
32	THR	HG2	H	1,16	42	GLU	HB2	H	2,12
32	THR	N	N	121,43	42	GLU	HB3	H	2,12
33	TYR	H	H	9,41	42	GLU	HG2	H	2,42
33	TYR	HA	H	4,55	42	GLU	HG3	H	2,76
33	TYR	HB2	H	2,54	42	GLU	N	N	119,45
33	TYR	HB3	H	2,73	43	ASN	H	H	8,45
33	TYR	HD1	H	8,53	43	ASN	HA	H	4,56
33	TYR	HD2	H	8,53	43	ASN	HB2	H	2,77
33	TYR	HE1	H	6,88	43	ASN	HB3	H	2,86
33	TYR	HE2	H	6,88	43	ASN	HD21	H	7,75
33	TYR	N	N	127,65	43	ASN	HD22	H	7,40
34	ASN	H	H	9,17	43	ASN	N	N	115,86
34	ASN	HA	H	4,22	43	ASN	ND2	N	111,70
34	ASN	HB2	H	2,80	44	LEU	H	H	7,70
34	ASN	HB3	H	2,80	44	LEU	HA	H	4,26
34	ASN	HD21	H	7,45	44	LEU	HB2	H	1,84
34	ASN	HD22	H	6,84	44	LEU	HB3	H	2,30
34	ASN	N	N	120,98	44	LEU	HG	H	1,55
34	ASN	ND2	N	110,43	44	LEU	HD1	H	0,93
35	ASN	H	H	7,43	44	LEU	HD2	H	0,93
35	ASN	HA	H	5,13	44	LEU	N	N	121,04
35	ASN	HB2	H	3,04	45	ILE	H	H	8,31
35	ASN	HB3	H	3,36	45	ILE	HA	H	3,90
35	ASN	HD21	H	7,90	45	ILE	HB	H	1,94
35	ASN	HD22	H	6,37	45	ILE	HG12	H	1,26
35	ASN	N	N	107,2	45	ILE	HG13	H	1,26

45	ILE	HG2	H	0,79	52	ILE	HB	H	1,73
45	ILE	HD1	H	0,79	52	ILE	HG12	H	0,92
45	ILE	N	N	117,24	52	ILE	HG13	H	0,92
46	ARG	H	H	8,64	52	ILE	HG2	H	0,74
46	ARG	HA	H	4,33	52	ILE	HD1	H	0,56
46	ARG	HB2	H	1,98	52	ILE	N	N	120,27
46	ARG	HB3	H	2,02	53	ARG	H	H	9,69
46	ARG	HG2	H	1,73	53	ARG	HA	H	4,44
46	ARG	HG3	H	1,73	53	ARG	HB2	H	1,66
46	ARG	HD2	H	3,19	53	ARG	HB3	H	1,66
46	ARG	HD3	H	3,32	53	ARG	HG2	H	1,66
46	ARG	HE	H	7,37	53	ARG	HG3	H	1,66
46	ARG	N	N	117,97	53	ARG	HD2	H	3,24
46	ARG	NE	N	85,40	53	ARG	HD3	H	3,24
47	GLN	H	H	7,76	53	ARG	HE	H	7,32
47	GLN	HA	H	4,12	53	ARG	N	N	131,89
47	GLN	HB2	H	2,33	53	ARG	NE	N	
47	GLN	HB3	H	2,33	54	SER	H	H	7,96
47	GLN	HG2	H	2,33	54	SER	HA	H	4,67
47	GLN	HG3	H	2,33	54	SER	HB2	H	3,85
47	GLN	HE21	H	7,73	54	SER	HB3	H	3,97
47	GLN	HE22	H	6,90	54	SER	N	N	111,08
47	GLN	N	N	115,47	55	THR	H	H	8,55
47	GLN	NE2	N	113,21	55	THR	HA	H	4,40
48	THR	H	H	8,11	55	THR	HB	H	4,39
48	THR	HA	H	4,57	55	THR	HG2	H	1,29
48	THR	HB	H	4,38	55	THR	N	N	114,26
48	THR	HG2	H	1,13	56	GLY	H	H	8,16
48	THR	N	N	108,99	56	GLY	HA2	H	3,52
49	ASN	H	H	8,65	56	GLY	HA3	H	4,35
49	ASN	HA	H	4,85	56	GLY	N	N	113,50
49	ASN	HB2	H	2,46	57	LYS	H	H	7,84
49	ASN	HB3	H	2,76	57	LYS	HA	H	4,13
49	ASN	HD21	H	7,56	57	LYS	HB2	H	1,73
49	ASN	HD22	H	6,87	57	LYS	HB3	H	1,73
49	ASN	N	N	119,74	57	LYS	HG2	H	1,37
49	ASN	ND2	N	112,31	57	LYS	HG3	H	1,37
50	THR	H	H	7,82	57	LYS	HD2	H	1,73
50	THR	HA	H	4,11	57	LYS	HD3	H	1,73
50	THR	HB	H	4,09	57	LYS	HE2	H	2,97
50	THR	HG2	H	1,36	57	LYS	HE3	H	2,97
50	THR	N	N	118,91	57	LYS	N	N	113,24
51	HIS	H	H	8,70	58	CYS	H	H	8,26
51	HIS	HA	H	4,81	58	CYS	HA	H	4,48
51	HIS	HB2	H	3,12	58	CYS	HB2	H	2,58
51	HIS	HB3	H	3,16	58	CYS	HB3	H	3,15
51	HIS	HD1	H		58	CYS	N	N	120,38
51	HIS	HD2	H	8,52	59	GLU	H	H	8,15
51	HIS	HE1	H	7,28	59	GLU	HA	H	4,09
51	HIS	HE2	H		59	GLU	HB2	H	1,86
51	HIS	N	N	126,26	59	GLU	HB3	H	2,03
51	HIS	ND1	N		59	GLU	HG2	H	2,18
51	HIS	NE2	N		59	GLU	HG3	H	2,18
52	ILE	H	H	8,69	59	GLU	N	N	126,97
52	ILE	HA	H	3,70					

10.2.2 Chemische Verschiebungen für GPdom15

Angabe der Verschiebungen wie in der BMRB-Datenbank (<http://www.bmrb.wisc.edu>) unter der Zugriffsnummer 6180 hinterlegt.

1	ASP	H	H	8,59	2	SER	HB2	H	3,89
1	ASP	HA	H	4,60	2	SER	HB3	H	3,89
1	ASP	HB2	H	2,71	2	SER	N	N	116,56
1	ASP	HB3	H	2,71	3	GLU	H	H	8,39
1	ASP	N	N	120,64	3	GLU	HA	H	4,20
2	SER	H	H	8,27	3	GLU	HB2	H	2,03
2	SER	HA	H	4,38	3	GLU	HB3	H	2,03

3	GLU	HG2	H	2,29	13	ARG	H	H	8,76
3	GLU	HG3	H	2,29	13	ARG	HA	H	3,83
3	GLU	N	N	122,42	13	ARG	HB2	H	2,02
4	MET	H	H	8,07	13	ARG	HB3	H	2,22
4	MET	HA	H	4,17	13	ARG	HG2	H	1,57
4	MET	HB2	H	2,20	13	ARG	HG3	H	1,57
4	MET	HB3	H	2,20	13	ARG	HD2	H	3,21
4	MET	HG2	H	2,54	13	ARG	HD3	H	3,21
4	MET	HG3	H	2,54	13	ARG	HE	H	7,25
4	MET	N	N	118,77	13	ARG	N	N	117,35
5	CYS	H	H	8,02	13	ARG	NE	N	84,26
5	CYS	HA	H	4,85	14	ILE	H	H	8,30
5	CYS	HB2	H	2,94	14	ILE	HA	H	4,12
5	CYS	HB3	H	3,57	14	ILE	HB	H	1,71
5	CYS	N	N	114,54	14	ILE	HG12	H	1,12
6	LYS	H	H	7,45	14	ILE	HG13	H	1,47
6	LYS	HA	H	4,20	14	ILE	HG2	H	0,86
6	LYS	HB2	H	1,91	14	ILE	HD1	H	0,86
6	LYS	HB3	H	1,91	14	ILE	N	N	119,75
6	LYS	HG2	H	1,37	15	GLY	H	H	8,16
6	LYS	HG3	H	1,46	15	GLY	HA2	H	3,53
6	LYS	HD2	H	1,68	15	GLY	HA3	H	4,55
6	LYS	HD3	H	1,68	15	GLY	N	N	108,36
6	LYS	HE2	H	2,95	16	TYR	H	H	9,55
6	LYS	HE3	H	2,95	16	TYR	HA	H	4,81
6	LYS	N	N	119,41	16	TYR	HB2	H	2,66
7	ASP	H	H	8,01	16	TYR	HB3	H	2,93
7	ASP	HA	H	4,51	16	TYR	HD1	H	7,08
7	ASP	HB2	H	1,86	16	TYR	HD2	H	7,08
7	ASP	HB3	H	2,43	16	TYR	HE1	H	6,84
7	ASP	N	N	117,60	16	TYR	HE2	H	6,84
8	TYR	H	H	7,40	16	TYR	N	N	122,36
8	TYR	HA	H	5,01	17	LEU	H	H	8,61
8	TYR	HB2	H	2,96	17	LEU	HA	H	4,53
8	TYR	HB3	H	3,50	17	LEU	HB2	H	1,56
8	TYR	HD1	H	7,17	17	LEU	HB3	H	1,56
8	TYR	HD2	H	7,09	17	LEU	HG	H	1,56
8	TYR	HE1	H	6,79	17	LEU	HD1	H	0,84
8	TYR	HE2	H	6,82	17	LEU	HD2	H	0,84
8	TYR	N	N	119,49	17	LEU	N	N	124,62
9	ARG	H	H	9,17	18	CYS	H	H	8,14
9	ARG	HA	H	4,35	18	CYS	HA	H	5,43
9	ARG	HB2	H	1,86	18	CYS	HB2	H	2,56
9	ARG	HB3	H	1,86	18	CYS	HB3	H	2,91
9	ARG	HG2	H	1,64	18	CYS	N	N	121,35
9	ARG	HG3	H	1,64	19	PRO	HA	H	4,66
9	ARG	HD2	H	3,25	19	PRO	HB2	H	2,08
9	ARG	HD3	H	3,25	19	PRO	HB3	H	2,48
9	ARG	HE	H	7,22	19	PRO	HG2	H	2,28
9	ARG	N	N	123,48	19	PRO	HG3	H	2,28
9	ARG	NE	N	84,72	19	PRO	HD2	H	3,34
10	VAL	H	H	8,08	19	PRO	HD3	H	4,00
10	VAL	HA	H	4,18	20	LYS	H	H	8,68
10	VAL	HB	H	1,31	20	LYS	HA	H	4,19
10	VAL	HG1	H	0,55	20	LYS	HB2	H	1,93
10	VAL	HG2	H	0,18	20	LYS	HB3	H	1,93
10	VAL	N	N	121,80	20	LYS	HG2	H	1,45
11	LEU	H	H	8,58	20	LYS	HG3	H	1,45
11	LEU	HA	H	4,90	20	LYS	HD2	H	1,70
11	LEU	HB2	H	1,55	20	LYS	HD3	H	1,70
11	LEU	HB3	H	1,55	20	LYS	HE2	H	3,00
11	LEU	HG	H	1,55	20	LYS	HE3	H	3,00
11	LEU	HD1	H	0,90	20	LYS	N	N	119,01
11	LEU	HD2	H	0,90	21	ASP	H	H	7,60
11	LEU	N	N	128,85	21	ASP	HA	H	4,27
12	PRO	HA	H	4,22	21	ASP	HB2	H	2,44
12	PRO	HB2	H	2,00	21	ASP	HB3	H	2,44
12	PRO	HB3	H	2,34	21	ASP	N	N	117,64
12	PRO	HG2	H	2,11	22	LEU	H	H	8,61
12	PRO	HG3	H	2,11	22	LEU	HA	H	4,54
12	PRO	HD2	H	3,65	22	LEU	HB2	H	1,65
12	PRO	HD3	H	3,88	22	LEU	HB3	H	1,65

22	LEU	HG	H	1,65	33	TYR	HE1	H	6,85
22	LEU	HD1	H	0,92	33	TYR	HE2	H	6,85
22	LEU	HD2	H	0,92	33	TYR	N	N	127,47
22	LEU	N	N	124,79	34	ASN	H	H	9,15
23	LYS	H	H	8,88	34	ASN	HA	H	4,21
23	LYS	HA	H	4,62	34	ASN	HB2	H	2,77
23	LYS	HB2	H	1,90	34	ASN	HB3	H	2,77
23	LYS	HB3	H	1,90	34	ASN	HD21	H	7,45
23	LYS	HG2	H	1,41	34	ASN	HD22	H	6,83
23	LYS	HG3	H	1,41	34	ASN	N	N	120,71
23	LYS	HD2	H	1,69	34	ASN	ND2	N	110,32
23	LYS	HD3	H	1,69	35	ASN	H	H	7,46
23	LYS	HE2	H	3,03	35	ASN	HA	H	5,16
23	LYS	HE3	H	3,03	35	ASN	HB2	H	3,04
23	LYS	N	N	128,32	35	ASN	HB3	H	3,36
24	PRO	HA	H	4,68	35	ASN	HD21	H	7,93
24	PRO	HB2	H	1,48	35	ASN	HD22	H	6,37
24	PRO	HB3	H	2,07	35	ASN	N	N	107,04
24	PRO	HG2	H	1,90	35	ASN	ND2	N	113,83
24	PRO	HG3	H	1,90	36	PRO	HA	H	4,01
24	PRO	HD2	H	3,37	36	PRO	HB2	H	2,22
24	PRO	HD3	H	3,62	36	PRO	HB3	H	2,50
25	VAL	H	H	8,51	36	PRO	HG2	H	2,30
25	VAL	HA	H	4,76	36	PRO	HG3	H	2,30
25	VAL	HB	H	2,18	36	PRO	HD2	H	3,90
25	VAL	HG1	H	1,04	36	PRO	HD3	H	4,18
25	VAL	HG2	H	0,68	37	CYS	H	H	7,56
25	VAL	N	N	111,57	37	CYS	HA	H	3,19
26	CYS	H	H	8,87	37	CYS	HB2	H	0,87
26	CYS	HA	H	5,33	37	CYS	HB3	H	2,73
26	CYS	HB2	H	2,68	37	CYS	N	N	115,59
26	CYS	HB3	H	3,12	38	MET	H	H	7,91
26	CYS	N	N	121,56	38	MET	HA	H	4,29
27	GLY	H	H	9,82	38	MET	HB2	H	2,20
27	GLY	HA2	H	4,22	38	MET	HB3	H	2,43
27	GLY	HA3	H	4,78	38	MET	HG2	H	2,72
27	GLY	N	N	116,04	38	MET	HG3	H	2,72
28	ASP	H	H	9,14	38	MET	N	N	118,35
28	ASP	HA	H	4,41	39	LEU	H	H	6,91
28	ASP	HB2	H	2,50	39	LEU	HA	H	3,61
28	ASP	HB3	H	3,12	39	LEU	HB2	H	0,45
28	ASP	N	N	120,71	39	LEU	HB3	H	1,78
29	ASP	H	H	8,38	39	LEU	HG	H	0,91
29	ASP	HA	H	4,54	39	LEU	HD1	H	0,44
29	ASP	HB2	H	2,73	39	LEU	HD2	H	-0,03
29	ASP	HB3	H	3,08	39	LEU	N	N	121,88
29	ASP	N	N	117,21	40	CYS	H	H	7,71
30	GLY	H	H	8,52	40	CYS	HA	H	3,91
30	GLY	HA2	H	3,74	40	CYS	HB2	H	2,03
30	GLY	HA3	H	4,10	40	CYS	HB3	H	3,14
30	GLY	N	N	109,35	40	CYS	N	N	118,99
31	GLN	H	H	7,93	41	HIS	H	H	8,65
31	GLN	HA	H	4,47	41	HIS	HA	H	4,39
31	GLN	HB2	H	1,73	41	HIS	HB2	H	3,13
31	GLN	HB3	H	1,73	41	HIS	HB3	H	3,42
31	GLN	HG2	H	1,97	41	HIS	HD1	H	
31	GLN	HG3	H	1,97	41	HIS	HD2	H	8,31
31	GLN	HE21	H	7,22	41	HIS	HE1	H	7,10
31	GLN	HE22	H	6,76	41	HIS	HE2	H	
31	GLN	N	N	120,03	41	HIS	N	N	119,63
31	GLN	NE2	N	112,50	41	HIS	ND1	N	
32	THR	H	H	8,42	41	HIS	NE2	N	
32	THR	HA	H	4,95	42	GLU	H	H	8,30
32	THR	HB	H	3,96	42	GLU	HA	H	4,08
32	THR	HG2	H	1,16	42	GLU	HB2	H	2,13
32	THR	N	N	121,59	42	GLU	HB3	H	2,13
33	TYR	H	H	9,42	42	GLU	HG2	H	2,46
33	TYR	HA	H	4,54	42	GLU	HG3	H	2,78
33	TYR	HB2	H	2,54	42	GLU	N	N	119,29
33	TYR	HB3	H	2,73	43	ASN	H	H	8,46
33	TYR	HD1	H	8,50	43	ASN	HA	H	4,55
33	TYR	HD2	H	8,50	43	ASN	HB2	H	2,80

43	ASN	HB3	H	2,80	52	ILE	HA	H	3,68
43	ASN	HD21	H	7,67	52	ILE	HB	H	1,72
43	ASN	HD22	H	7,39	52	ILE	HG12	H	0,92
43	ASN	N	N	116,22	52	ILE	HG13	H	0,92
43	ASN	ND2	N	111,30	52	ILE	HG2	H	0,74
44	LEU	H	H	7,68	52	ILE	HD1	H	0,58
44	LEU	HA	H	4,26	52	ILE	N	N	120,55
44	LEU	HB2	H	1,85	53	ARG	H	H	9,70
44	LEU	HB3	H	2,25	53	ARG	HA	H	4,45
44	LEU	HG	H	1,56	53	ARG	HB2	H	1,68
44	LEU	HD1	H	0,94	53	ARG	HB3	H	1,68
44	LEU	HD2	H	0,94	53	ARG	HG2	H	1,68
44	LEU	N	N	120,64	53	ARG	HG3	H	1,68
45	ILE	H	H	8,16	53	ARG	HD2	H	3,23
45	ILE	HA	H	3,91	53	ARG	HD3	H	3,23
45	ILE	HB	H	1,91	53	ARG	HE	H	7,31
45	ILE	HG12	H	1,27	53	ARG	N	N	131,66
45	ILE	HG13	H	1,27	53	ARG	NE	N	84,78
45	ILE	HG2	H	0,81	54	SER	H	H	7,95
45	ILE	HD1	H	0,81	54	SER	HA	H	4,68
45	ILE	N	N	116,80	54	SER	HB2	H	3,84
46	ARG	H	H	8,59	54	SER	HB3	H	3,98
46	ARG	HA	H	4,33	54	SER	N	N	110,90
46	ARG	HB2	H	1,97	55	THR	H	H	8,54
46	ARG	HB3	H	1,97	55	THR	HA	H	4,40
46	ARG	HG2	H	1,72	55	THR	HB	H	4,36
46	ARG	HG3	H	1,72	55	THR	HG2	H	1,28
46	ARG	HD2	H	3,32	55	THR	N	N	114,03
46	ARG	HD3	H	3,19	56	GLY	H	H	8,17
46	ARG	HE	H	7,30	56	GLY	HA2	H	3,52
46	ARG	N	N	117,62	56	GLY	HA3	H	4,37
46	ARG	NE	N	85,30	56	GLY	N	N	113,22
47	Gln	H	H	7,77	57	LYS	H	H	7,92
47	Gln	HA	H	4,11	57	LYS	HA	H	4,12
47	Gln	HB2	H	2,34	57	LYS	HB2	H	1,81
47	Gln	HB3	H	2,34	57	LYS	HB3	H	1,81
47	Gln	HG2	H	2,34	57	LYS	HG2	H	1,40
47	Gln	HG3	H	2,34	57	LYS	HG3	H	1,40
47	Gln	HE21	H	7,71	57	LYS	HD2	H	1,67
47	Gln	HE22	H	6,88	57	LYS	HD3	H	1,67
47	Gln	N	N	115,33	57	LYS	HE2	H	2,95
47	Gln	NE2	N	113,03	57	LYS	HE3	H	2,95
48	THR	H	H	8,09	57	LYS	N	N	113,22
48	THR	HA	H	4,56	58	CYS	H	H	8,38
48	THR	HB	H	4,36	58	CYS	HA	H	4,45
48	THR	HG2	H	1,13	58	CYS	HB2	H	2,59
48	THR	N	N	108,86	58	CYS	HB3	H	3,09
49	ASN	H	H	8,57	58	CYS	N	N	120,75
49	ASN	HA	H	4,82	59	GLU	H	H	8,86
49	ASN	HB2	H	2,44	59	GLU	HA	H	4,23
49	ASN	HB3	H	2,73	59	GLU	HB2	H	1,94
49	ASN	HD21	H	7,54	59	GLU	HB3	H	1,94
49	ASN	HD22	H	6,89	59	GLU	HG2	H	2,28
49	ASN	N	N	119,77	59	GLU	HG3	H	2,28
49	ASN	ND2	N	112,02	59	GLU	N	N	121,16
50	THR	H	H	7,77	60	GLU	H	H	8,30
50	THR	HA	H	4,07	60	GLU	HA	H	4,31
50	THR	HB	H	4,06	60	GLU	HB2	H	1,96
50	THR	HG2	H	1,36	60	GLU	HB3	H	1,96
50	THR	N	N	118,46	60	GLU	HG2	H	2,27
51	HIS	H	H	8,79	60	GLU	HG3	H	2,27
51	HIS	HA	H	4,82	60	GLU	N	N	121,70
51	HIS	HB2	H	3,11	61	SER	H	H	8,27
51	HIS	HB3	H	3,33	61	SER	HA	H	4,31
51	HIS	HD1	H		61	SER	HB2	H	3,90
51	HIS	HD2	H	8,41	61	SER	HB3	H	3,90
51	HIS	HE1	H	7,27	61	SER	N	N	116,51
51	HIS	HE2	H		62	SER	H	H	8,35
51	HIS	N	N	125,16	62	SER	HA	H	4,54
51	HIS	ND1	N		62	SER	HB2	H	3,88
51	HIS	NE2	N		62	SER	HB3	H	3,88
52	ILE	H	H	8,80	62	SER	N	N	117,92

63	THR	H	H	8,24	71	MET	H	H	8,24
63	THR	HA	H	4,64	71	MET	HA	H	4,83
63	THR	HB	H	4,16	71	MET	HB2	H	1,98
63	THR	HG2	H	1,24	71	MET	HB3	H	1,98
63	THR	N	N	118,13	71	MET	HG2	H	2,61
64	PRO	HA	H	4,41	71	MET	HG3	H	2,61
64	PRO	HB2	H	1,95	71	MET	N	N	123,17
64	PRO	HB3	H	1,95	72	PRO	HA	H	4,67
64	PRO	HG2	H	1,95	72	PRO	HB2	H	1,81
64	PRO	HG3	H	1,95	72	PRO	HB3	H	2,03
64	PRO	HD2	H	3,85	72	PRO	HG2	H	2,06
64	PRO	HD3	H	3,85	72	PRO	HG3	H	2,06
65	GLY	H	H	8,52	72	PRO	HD2	H	3,48
65	GLY	HA2	H	4,03	72	PRO	HD3	H	3,99
65	GLY	HA3	H	4,03	73	PRO	HA	H	4,45
65	GLY	N	N	109,38	73	PRO	HB2	H	1,88
66	THR	H	H	8,05	73	PRO	HB3	H	2,32
66	THR	HA	H	4,45	73	PRO	HG2	H	1,99
66	THR	HB	H	4,27	73	PRO	HG3	H	1,99
66	THR	HG2	H	1,21	73	PRO	HD2	H	3,64
66	THR	N	N	113,42	73	PRO	HD3	H	3,85
67	THR	H	H	8,23	74	SER	H	H	8,27
67	THR	HA	H	4,38	74	SER	HA	H	4,42
67	THR	HB	H	4,38	74	SER	HB2	H	3,88
67	THR	HG2	H	1,22	74	SER	HB3	H	3,88
67	THR	N	N	116,72	74	SER	N	N	115,38
68	ALA	H	H	8,36	75	ASP	H	H	8,46
68	ALA	HA	H	4,32	75	ASP	HA	H	4,59
68	ALA	HB	H	1,40	75	ASP	HB2	H	2,69
68	ALA	N	N	126,73	75	ASP	HB3	H	2,69
69	ALA	H	H	8,34	75	ASP	N	N	120,89
69	ALA	HA	H	4,35	76	GLU	H	H	7,86
69	ALA	HB	H	1,39	76	GLU	HA	H	4,12
69	ALA	N	N	127,61	76	GLU	HB2	H	1,88
70	SER	H	H	8,19	76	GLU	HB3	H	2,07
70	SER	HA	H	4,44	76	GLU	HG2	H	2,21
70	SER	HB2	H	3,86	76	GLU	HG3	H	2,21
70	SER	HB3	H	3,86	76	GLU	N	N	125,34
70	SER	N	N	114,87					

10.3 Experimentelle Randbedingungen für die Berechnung der Strukturen

Die experimentellen Randbedingungen sind im verkürzten XPLOR-Format angegeben.

10.3.1 Distanzbeschränkungen für GPdom15kurz

(resid 1 name HA)	(resid 2 name HA)	5.00	(resid 4 name HN)	(resid 1 name HT*)	5.00
(resid 1 name HA)	(resid 2 name HB2)	5.00	(resid 4 name HN)	(resid 2 name HA)	5.00
(resid 1 name HA)	(resid 2 name HN)	2.70	(resid 4 name HN)	(resid 2 name HB1)	5.00
(resid 1 name HA)	(resid 3 name HN)	5.00	(resid 4 name HN)	(resid 2 name HB2)	5.00
(resid 1 name HB*)	(resid 2 name HA)	5.00	(resid 4 name HN)	(resid 3 name HA)	5.00
(resid 1 name HB*)	(resid 2 name HB1)	5.00	(resid 4 name HN)	(resid 3 name HB1)	3.50
(resid 1 name HB*)	(resid 2 name HN)	5.00	(resid 4 name HN)	(resid 3 name HB2)	3.50
(resid 1 name HB*)	(resid 3 name HN)	5.00	(resid 4 name HN)	(resid 3 name HN)	2.70
(resid 1 name HB*)	(resid 51 name HB2)	5.00	(resid 4 name HN)	(resid 6 name HN)	5.00
(resid 1 name HB*)	(resid 52 name HB)	5.00	(resid 5 name HA)	(resid 6 name HA)	5.00
(resid 1 name HB*)	(resid 52 name HG1*)	5.00	(resid 5 name HA)	(resid 8 name HB1)	5.00
(resid 1 name HB*)	(resid 52 name HN)	5.00	(resid 5 name HA)	(resid 8 name HB2)	5.00
(resid 1 name HT*)	(resid 2 name HN)	5.00	(resid 5 name HA)	(resid 40 name HB2)	5.00
(resid 2 name HA)	(resid 3 name HN)	3.50	(resid 5 name HB1)	(resid 6 name HA)	5.00
(resid 2 name HA)	(resid 5 name HB2)	5.00	(resid 5 name HB1)	(resid 40 name HB1)	5.00
(resid 2 name HB1)	(resid 3 name HN)	5.00	(resid 5 name HB2)	(resid 8 name HD1)	5.00
(resid 2 name HB2)	(resid 3 name HN)	5.00	(resid 5 name HB2)	(resid 40 name HA)	5.00
(resid 2 name HN)	(resid 3 name HN)	5.00	(resid 5 name HB2)	(resid 40 name HB1)	5.00
(resid 2 name HN)	(resid 39 name HD*)	5.00	(resid 5 name HB2)	(resid 40 name HB2)	5.00
(resid 2 name HN)	(resid 51 name HA)	5.00	(resid 5 name HN)	(resid 2 name HA)	5.00
(resid 2 name HN)	(resid 52 name HG1*)	5.00	(resid 5 name HN)	(resid 3 name HA)	5.00
(resid 2 name HN)	(resid 52 name HN)	5.00	(resid 5 name HN)	(resid 3 name HN)	5.00
(resid 3 name HG1)	(resid 6 name HD*)	5.00	(resid 5 name HN)	(resid 4 name HA)	5.00
(resid 3 name HG2)	(resid 6 name HD*)	5.00	(resid 5 name HN)	(resid 4 name HB*)	3.50
(resid 4 name HN)	(resid 1 name HB*)	5.00	(resid 5 name HN)	(resid 4 name HG1)	5.00

(resid 5 name HN)	(resid 4 name HG2)	5.00	(resid 11 name HN)	(resid 14 name HB)	5.00
(resid 5 name HN)	(resid 6 name HB*)	5.00	(resid 11 name HN)	(resid 14 name HD*)	5.00
(resid 5 name HN)	(resid 6 name HG1)	5.00	(resid 11 name HN)	(resid 14 name HG2*)	5.00
(resid 5 name HN)	(resid 6 name HN)	3.50	(resid 11 name HN)	(resid 15 name HA2)	5.00
(resid 5 name HN)	(resid 8 name HD1)	5.00	(resid 11 name HN)	(resid 15 name HN)	3.50
(resid 5 name HN)	(resid 40 name HB2)	5.00	(resid 13 name HA)	(resid 12 name HA)	5.00
(resid 6 name HN)	(resid 3 name HN)	5.00	(resid 13 name HA)	(resid 14 name HA)	5.00
(resid 6 name HN)	(resid 4 name HB*)	5.00	(resid 13 name HB1)	(resid 14 name HG12)	5.00
(resid 6 name HN)	(resid 5 name HA)	3.50	(resid 13 name HB2)	(resid 14 name HG12)	5.00
(resid 6 name HN)	(resid 5 name HB1)	5.00	(resid 13 name HN)	(resid 11 name HA)	5.00
(resid 6 name HN)	(resid 5 name HB2)	5.00	(resid 13 name HN)	(resid 11 name HD*)	5.00
(resid 6 name HN)	(resid 7 name HN)	3.50	(resid 13 name HN)	(resid 12 name HA)	3.50
(resid 7 name HN)	(resid 5 name HA)	5.00	(resid 13 name HN)	(resid 12 name HB1)	3.50
(resid 7 name HN)	(resid 6 name HA)	5.00	(resid 13 name HN)	(resid 12 name HB2)	5.00
(resid 7 name HN)	(resid 6 name HB*)	5.00	(resid 13 name HN)	(resid 12 name HD*)	5.00
(resid 7 name HN)	(resid 6 name HG1)	5.00	(resid 13 name HN)	(resid 12 name HG*)	5.00
(resid 7 name HN)	(resid 6 name HG2)	5.00	(resid 13 name HN)	(resid 14 name HD*)	5.00
(resid 7 name HN)	(resid 8 name HB*)	5.00	(resid 13 name HN)	(resid 14 name HG12)	5.00
(resid 7 name HN)	(resid 8 name HN)	3.50	(resid 13 name HN)	(resid 14 name HN)	3.50
(resid 8 name HA)	(resid 9 name HA)	5.00	(resid 13 name HN)	(resid 15 name HN)	5.00
(resid 8 name HD1)	(resid 5 name HA)	5.00	(resid 14 name HD*)	(resid 13 name HB1)	5.00
(resid 8 name HD1)	(resid 5 name HB1)	5.00	(resid 14 name HG2*)	(resid 15 name HA2)	5.00
(resid 8 name HD1)	(resid 7 name HN)	5.00	(resid 14 name HN)	(resid 11 name HB*)	5.00
(resid 8 name HD2)	(resid 10 name HB)	5.00	(resid 14 name HN)	(resid 11 name HD2*)	5.00
(resid 8 name HD2)	(resid 10 name HG1*)	5.00	(resid 14 name HN)	(resid 11 name HN)	3.50
(resid 8 name HD2)	(resid 10 name HG2*)	5.00	(resid 14 name HN)	(resid 12 name HA)	5.00
(resid 8 name HE1)	(resid 5 name HA)	5.00	(resid 14 name HN)	(resid 13 name HA)	3.50
(resid 8 name HE1)	(resid 5 name HB1)	5.00	(resid 14 name HN)	(resid 13 name HB1)	5.00
(resid 8 name HE2)	(resid 10 name HB)	5.00	(resid 14 name HN)	(resid 13 name HB2)	5.00
(resid 8 name HE2)	(resid 10 name HG1*)	5.00	(resid 14 name HN)	(resid 13 name HD*)	5.00
(resid 8 name HE2)	(resid 10 name HG2*)	5.00	(resid 14 name HN)	(resid 13 name HG*)	5.00
(resid 8 name HN)	(resid 5 name HA)	5.00	(resid 14 name HN)	(resid 15 name HA1)	5.00
(resid 8 name HN)	(resid 5 name HB2)	5.00	(resid 14 name HN)	(resid 15 name HA2)	5.00
(resid 8 name HN)	(resid 6 name HA)	5.00	(resid 14 name HN)	(resid 15 name HN)	2.70
(resid 8 name HN)	(resid 7 name HA)	3.50	(resid 15 name HA1)	(resid 10 name HG2*)	5.00
(resid 8 name HN)	(resid 7 name HB1)	5.00	(resid 15 name HA2)	(resid 16 name HA)	5.00
(resid 8 name HN)	(resid 7 name HB2)	5.00	(resid 15 name HN)	(resid 10 name HG1*)	5.00
(resid 8 name HN)	(resid 9 name HN)	5.00	(resid 15 name HN)	(resid 10 name HG2*)	5.00
(resid 9 name HA)	(resid 8 name HD2)	5.00	(resid 15 name HN)	(resid 11 name HB*)	5.00
(resid 9 name HA)	(resid 10 name HA)	5.00	(resid 15 name HN)	(resid 13 name HA)	5.00
(resid 9 name HG*)	(resid 10 name HN)	5.00	(resid 15 name HN)	(resid 14 name HA)	5.00
(resid 9 name HN)	(resid 8 name HA)	2.70	(resid 15 name HN)	(resid 14 name HB)	3.50
(resid 9 name HN)	(resid 8 name HB1)	5.00	(resid 15 name HN)	(resid 14 name HG11)	5.00
(resid 9 name HN)	(resid 8 name HB2)	5.00	(resid 15 name HN)	(resid 14 name HG12)	5.00
(resid 9 name HN)	(resid 8 name HD1)	5.00	(resid 15 name HN)	(resid 14 name HG2*)	3.50
(resid 10 name HA)	(resid 11 name HA)	5.00	(resid 15 name HN)	(resid 16 name HN)	5.00
(resid 10 name HA)	(resid 11 name HB*)	5.00	(resid 16 name HD*)	(resid 10 name HG1*)	5.00
(resid 10 name HA)	(resid 11 name HD1*)	5.00	(resid 16 name HD*)	(resid 10 name HG2*)	5.00
(resid 10 name HA)	(resid 14 name HG2*)	5.00	(resid 16 name HD*)	(resid 17 name HN)	5.00
(resid 10 name HA)	(resid 16 name HA)	5.00	(resid 16 name HD*)	(resid 18 name HA)	5.00
(resid 10 name HB)	(resid 9 name HA)	5.00	(resid 16 name HD*)	(resid 18 name HN)	5.00
(resid 10 name HB)	(resid 16 name HD*)	5.00	(resid 16 name HD*)	(resid 40 name HB1)	5.00
(resid 10 name HB)	(resid 16 name HE*)	5.00	(resid 16 name HD*)	(resid 41 name HA)	5.00
(resid 10 name HG1*)	(resid 11 name HA)	5.00	(resid 16 name HD*)	(resid 44 name HB1)	5.00
(resid 10 name HG1*)	(resid 11 name HB*)	5.00	(resid 16 name HD*)	(resid 44 name HB2)	5.00
(resid 10 name HG1*)	(resid 11 name HD1*)	5.00	(resid 16 name HD*)	(resid 44 name HD1*)	5.00
(resid 10 name HG1*)	(resid 14 name HB)	5.00	(resid 16 name HD*)	(resid 44 name HG)	5.00
(resid 10 name HG1*)	(resid 14 name HG2*)	5.00	(resid 16 name HE*)	(resid 10 name HG1*)	5.00
(resid 10 name HG1*)	(resid 15 name HA1)	5.00	(resid 16 name HE*)	(resid 10 name HG2*)	5.00
(resid 10 name HG1*)	(resid 15 name HA2)	5.00	(resid 16 name HE*)	(resid 44 name HD1*)	5.00
(resid 10 name HG1*)	(resid 16 name HA)	5.00	(resid 16 name HN)	(resid 15 name HA1)	3.50
(resid 10 name HG2*)	(resid 9 name HA)	5.00	(resid 16 name HN)	(resid 15 name HA2)	5.00
(resid 10 name HG2*)	(resid 15 name HA2)	5.00	(resid 16 name HN)	(resid 41 name HE*)	5.00
(resid 10 name HG2*)	(resid 16 name HA)	5.00	(resid 17 name HA)	(resid 18 name HA)	5.00
(resid 10 name HN)	(resid 8 name HE*)	5.00	(resid 17 name HB*)	(resid 16 name HA)	5.00
(resid 10 name HN)	(resid 9 name HA)	2.70	(resid 17 name HD*)	(resid 18 name HA)	5.00
(resid 10 name HN)	(resid 9 name HB*)	3.50	(resid 17 name HN)	(resid 10 name HG1*)	5.00
(resid 10 name HN)	(resid 9 name HD*)	5.00	(resid 17 name HN)	(resid 10 name HG2*)	5.00
(resid 10 name HN)	(resid 9 name HG1)	5.00	(resid 17 name HN)	(resid 14 name HG2*)	5.00
(resid 10 name HN)	(resid 9 name HG2)	5.00	(resid 17 name HN)	(resid 16 name HA)	2.70
(resid 10 name HN)	(resid 9 name HN)	5.00	(resid 17 name HN)	(resid 16 name HB1)	5.00
(resid 10 name HN)	(resid 11 name HD*)	5.00	(resid 17 name HN)	(resid 16 name HB2)	3.50
(resid 11 name HA)	(resid 12 name HA)	5.00	(resid 17 name HN)	(resid 16 name HN)	5.00
(resid 11 name HA)	(resid 12 name HD1)	2.70	(resid 17 name HN)	(resid 18 name HN)	5.00
(resid 11 name HA)	(resid 12 name HD2)	2.70	(resid 18 name HA)	(resid 16 name HE*)	5.00
(resid 11 name HA)	(resid 12 name HG*)	5.00	(resid 18 name HA)	(resid 19 name HA)	5.00
(resid 11 name HB*)	(resid 12 name HD1)	5.00	(resid 18 name HA)	(resid 19 name HB*)	5.00
(resid 11 name HB*)	(resid 12 name HD2)	5.00	(resid 18 name HA)	(resid 19 name HD1)	2.70
(resid 11 name HB*)	(resid 12 name HG*)	5.00	(resid 18 name HA)	(resid 19 name HD2)	2.70
(resid 11 name HB*)	(resid 14 name HB)	5.00	(resid 18 name HA)	(resid 19 name HG*)	5.00
(resid 11 name HB*)	(resid 14 name HG12)	5.00	(resid 18 name HA)	(resid 35 name HD22)	5.00
(resid 11 name HG)	(resid 12 name HD1)	3.50	(resid 18 name HA)	(resid 37 name HA)	5.00
(resid 11 name HG)	(resid 12 name HD2)	5.00	(resid 18 name HA)	(resid 37 name HB1)	5.00
(resid 11 name HN)	(resid 10 name HA)	2.70	(resid 18 name HA)	(resid 37 name HB2)	5.00
(resid 11 name HN)	(resid 10 name HB)	5.00	(resid 18 name HB1)	(resid 19 name HD1)	5.00
(resid 11 name HN)	(resid 10 name HG1*)	5.00	(resid 18 name HB1)	(resid 19 name HD2)	5.00
(resid 11 name HN)	(resid 10 name HG2*)	5.00	(resid 18 name HB2)	(resid 17 name HA)	5.00
(resid 11 name HN)	(resid 10 name HN)	5.00	(resid 18 name HB2)	(resid 19 name HD1)	5.00
(resid 11 name HN)	(resid 12 name HD1)	5.00	(resid 18 name HB2)	(resid 19 name HD2)	3.50

(resid 18 name HN)	(resid 17 name HA)	2.70	(resid 25 name HG2*)	(resid 36 name HB1)	5.00
(resid 18 name HN)	(resid 17 name HB*)	5.00	(resid 25 name HG2*)	(resid 39 name HB1)	5.00
(resid 18 name HN)	(resid 17 name HD1*)	5.00	(resid 25 name HG2*)	(resid 52 name HA)	5.00
(resid 18 name HN)	(resid 17 name HD2*)	5.00	(resid 25 name HG2*)	(resid 52 name HG2*)	5.00
(resid 18 name HN)	(resid 17 name HG)	5.00	(resid 25 name HN)	(resid 24 name HA)	2.70
(resid 18 name HN)	(resid 19 name HD1)	5.00	(resid 25 name HN)	(resid 24 name HB1)	5.00
(resid 18 name HN)	(resid 19 name HD2)	5.00	(resid 25 name HN)	(resid 24 name HB2)	5.00
(resid 20 name HA)	(resid 35 name HD21)	5.00	(resid 25 name HN)	(resid 24 name HG*)	5.00
(resid 20 name HA)	(resid 35 name HD22)	5.00	(resid 25 name HN)	(resid 26 name HA)	5.00
(resid 20 name HB*)	(resid 19 name HB2)	5.00	(resid 25 name HN)	(resid 26 name HN)	5.00
(resid 20 name HN)	(resid 19 name HA)	2.70	(resid 25 name HN)	(resid 32 name HA)	5.00
(resid 20 name HN)	(resid 19 name HB1)	3.50	(resid 25 name HN)	(resid 32 name HG2*)	5.00
(resid 20 name HN)	(resid 19 name HB2)	3.50	(resid 25 name HN)	(resid 33 name HA)	5.00
(resid 20 name HN)	(resid 19 name HG*)	5.00	(resid 25 name HN)	(resid 33 name HB1)	5.00
(resid 20 name HN)	(resid 21 name HB2)	5.00	(resid 25 name HN)	(resid 33 name HB2)	5.00
(resid 20 name HN)	(resid 21 name HN)	3.50	(resid 25 name HN)	(resid 33 name HN)	3.50
(resid 21 name HA)	(resid 22 name HA)	5.00	(resid 25 name HN)	(resid 34 name HA)	5.00
(resid 21 name HN)	(resid 19 name HA)	5.00	(resid 25 name HN)	(resid 34 name HN)	5.00
(resid 21 name HN)	(resid 19 name HB1)	5.00	(resid 25 name HN)	(resid 35 name HA)	5.00
(resid 21 name HN)	(resid 19 name HB2)	3.50	(resid 26 name HA)	(resid 27 name HA2)	5.00
(resid 21 name HN)	(resid 19 name HG*)	5.00	(resid 26 name HA)	(resid 32 name HA)	2.70
(resid 21 name HN)	(resid 20 name HA)	3.50	(resid 26 name HA)	(resid 32 name HB)	5.00
(resid 21 name HN)	(resid 20 name HB*)	3.50	(resid 26 name HA)	(resid 32 name HG2*)	3.50
(resid 21 name HN)	(resid 20 name HG*)	5.00	(resid 26 name HA)	(resid 57 name HA)	5.00
(resid 21 name HN)	(resid 22 name HN)	5.00	(resid 26 name HA)	(resid 58 name HA)	5.00
(resid 21 name HN)	(resid 35 name HD21)	5.00	(resid 26 name HA)	(resid 58 name HB2)	5.00
(resid 21 name HN)	(resid 35 name HD22)	5.00	(resid 26 name HB1)	(resid 53 name HB*)	5.00
(resid 22 name HA)	(resid 35 name HA)	3.50	(resid 26 name HB1)	(resid 58 name HA)	5.00
(resid 22 name HA)	(resid 35 name HB1)	5.00	(resid 26 name HB2)	(resid 32 name HG2*)	5.00
(resid 22 name HB*)	(resid 21 name HA)	5.00	(resid 26 name HB2)	(resid 53 name HB*)	5.00
(resid 22 name HD1*)	(resid 24 name HD1)	5.00	(resid 26 name HB2)	(resid 58 name HA)	3.50
(resid 22 name HD1*)	(resid 24 name HD2)	5.00	(resid 26 name HN)	(resid 25 name HA)	2.70
(resid 22 name HD1*)	(resid 34 name HA)	5.00	(resid 26 name HN)	(resid 25 name HB)	2.70
(resid 22 name HD1*)	(resid 34 name HB1)	5.00	(resid 26 name HN)	(resid 25 name HG1*)	5.00
(resid 22 name HD1*)	(resid 34 name HB2)	5.00	(resid 26 name HN)	(resid 25 name HG2*)	5.00
(resid 22 name HD2*)	(resid 24 name HD2)	5.00	(resid 26 name HN)	(resid 27 name HN)	5.00
(resid 22 name HD2*)	(resid 24 name HG*)	5.00	(resid 26 name HN)	(resid 32 name HA)	5.00
(resid 22 name HD2*)	(resid 34 name HA)	5.00	(resid 26 name HN)	(resid 32 name HG2*)	5.00
(resid 22 name HD2*)	(resid 34 name HB1)	5.00	(resid 26 name HN)	(resid 52 name HD*)	5.00
(resid 22 name HD2*)	(resid 34 name HB2)	5.00	(resid 26 name HN)	(resid 52 name HG2*)	3.50
(resid 22 name HD2*)	(resid 35 name HA)	5.00	(resid 26 name HN)	(resid 53 name HB*)	5.00
(resid 22 name HN)	(resid 21 name HA)	2.70	(resid 26 name HN)	(resid 53 name HN)	5.00
(resid 22 name HN)	(resid 21 name HB1)	5.00	(resid 26 name HN)	(resid 54 name HN)	3.50
(resid 22 name HN)	(resid 21 name HB2)	5.00	(resid 26 name HN)	(resid 55 name HA)	3.50
(resid 22 name HN)	(resid 23 name HG*)	5.00	(resid 26 name HN)	(resid 56 name HN)	5.00
(resid 22 name HN)	(resid 23 name HN)	5.00	(resid 27 name HA1)	(resid 52 name HA)	3.50
(resid 23 name HA)	(resid 24 name HD1)	2.70	(resid 27 name HA2)	(resid 39 name HD1*)	5.00
(resid 23 name HA)	(resid 24 name HD2)	3.50	(resid 27 name HA2)	(resid 39 name HD2*)	5.00
(resid 23 name HA)	(resid 35 name HA)	5.00	(resid 27 name HA2)	(resid 50 name HG2*)	5.00
(resid 23 name HB*)	(resid 35 name HA)	5.00	(resid 27 name HA2)	(resid 52 name HA)	5.00
(resid 23 name HG*)	(resid 21 name HB1)	5.00	(resid 27 name HN)	(resid 25 name HG2*)	5.00
(resid 23 name HG*)	(resid 21 name HB2)	5.00	(resid 27 name HN)	(resid 26 name HA)	2.70
(resid 23 name HG*)	(resid 24 name HD2)	5.00	(resid 27 name HN)	(resid 26 name HB1)	5.00
(resid 23 name HG*)	(resid 35 name HA)	5.00	(resid 27 name HN)	(resid 26 name HB2)	5.00
(resid 23 name HN)	(resid 22 name HA)	2.70	(resid 27 name HN)	(resid 28 name HN)	5.00
(resid 23 name HN)	(resid 22 name HB*)	5.00	(resid 27 name HN)	(resid 29 name HN)	5.00
(resid 23 name HN)	(resid 22 name HD1*)	5.00	(resid 27 name HN)	(resid 30 name HN)	5.00
(resid 23 name HN)	(resid 22 name HD2*)	5.00	(resid 27 name HN)	(resid 31 name HA)	5.00
(resid 23 name HN)	(resid 22 name HG)	5.00	(resid 27 name HN)	(resid 31 name HB1)	5.00
(resid 23 name HN)	(resid 24 name HA)	5.00	(resid 27 name HN)	(resid 31 name HB2)	5.00
(resid 23 name HN)	(resid 24 name HD1)	5.00	(resid 27 name HN)	(resid 31 name HN)	5.00
(resid 23 name HN)	(resid 24 name HD2)	5.00	(resid 27 name HN)	(resid 32 name HA)	3.50
(resid 23 name HN)	(resid 35 name HA)	3.50	(resid 27 name HN)	(resid 32 name HG2*)	5.00
(resid 23 name HN)	(resid 35 name HB1)	3.50	(resid 27 name HN)	(resid 32 name HN)	5.00
(resid 23 name HN)	(resid 35 name HB2)	5.00	(resid 27 name HN)	(resid 33 name HD*)	5.00
(resid 23 name HN)	(resid 35 name HD21)	5.00	(resid 27 name HN)	(resid 33 name HN)	5.00
(resid 23 name HN)	(resid 35 name HD22)	5.00	(resid 27 name HN)	(resid 50 name HG2*)	5.00
(resid 23 name HN)	(resid 35 name HN)	5.00	(resid 27 name HN)	(resid 52 name HA)	5.00
(resid 23 name HN)	(resid 36 name HD1)	5.00	(resid 27 name HN)	(resid 58 name HB2)	5.00
(resid 23 name HN)	(resid 36 name HD2)	5.00	(resid 27 name HN)	(resid 58 name HN)	5.00
(resid 25 name HA)	(resid 26 name HA)	5.00	(resid 28 name HB1)	(resid 53 name HG*)	5.00
(resid 25 name HA)	(resid 52 name HG2*)	5.00	(resid 28 name HB2)	(resid 53 name HD*)	5.00
(resid 25 name HA)	(resid 55 name HA)	5.00	(resid 28 name HB2)	(resid 53 name HG*)	5.00
(resid 25 name HB)	(resid 26 name HA)	5.00	(resid 28 name HN)	(resid 27 name HA1)	2.70
(resid 25 name HB)	(resid 52 name HG1*)	5.00	(resid 28 name HN)	(resid 27 name HA2)	3.50
(resid 25 name HB)	(resid 52 name HG2*)	3.50	(resid 28 name HN)	(resid 29 name HN)	3.50
(resid 25 name HG1*)	(resid 33 name HB1)	5.00	(resid 28 name HN)	(resid 30 name HN)	5.00
(resid 25 name HG1*)	(resid 35 name HA)	5.00	(resid 28 name HN)	(resid 39 name HD*)	5.00
(resid 25 name HG1*)	(resid 36 name HA)	5.00	(resid 28 name HN)	(resid 50 name HA)	5.00
(resid 25 name HG1*)	(resid 36 name HB1)	5.00	(resid 28 name HN)	(resid 50 name HG2*)	2.70
(resid 25 name HG1*)	(resid 36 name HD1)	5.00	(resid 28 name HN)	(resid 51 name HN)	3.50
(resid 25 name HG1*)	(resid 36 name HG*)	5.00	(resid 28 name HN)	(resid 52 name HA)	5.00
(resid 25 name HG1*)	(resid 55 name HA)	5.00	(resid 28 name HN)	(resid 52 name HG2*)	5.00
(resid 25 name HG2*)	(resid 24 name HA)	5.00	(resid 28 name HN)	(resid 53 name HB*)	5.00
(resid 25 name HG2*)	(resid 26 name HA)	5.00	(resid 28 name HN)	(resid 53 name HD*)	5.00
(resid 25 name HG2*)	(resid 33 name HB1)	3.50	(resid 28 name HN)	(resid 53 name HG*)	5.00
(resid 25 name HG2*)	(resid 33 name HB2)	3.50	(resid 28 name HN)	(resid 53 name HN)	5.00
(resid 25 name HG2*)	(resid 35 name HA)	5.00	(resid 29 name HN)	(resid 27 name HA1)	5.00
(resid 25 name HG2*)	(resid 36 name HA)	3.50	(resid 29 name HN)	(resid 27 name HA2)	3.50

(resid 29 name HN)	(resid 28 name HA)	3.50	(resid 35 name HB2)	(resid 36 name HD2)	5.00
(resid 29 name HN)	(resid 28 name HB1)	5.00	(resid 35 name HD21)	(resid 18 name HB2)	5.00
(resid 29 name HN)	(resid 28 name HB2)	5.00	(resid 35 name HD21)	(resid 19 name HB2)	5.00
(resid 29 name HN)	(resid 30 name HA2)	5.00	(resid 35 name HD21)	(resid 21 name HB2)	5.00
(resid 29 name HN)	(resid 30 name HN)	2.70	(resid 35 name HD21)	(resid 22 name HA)	5.00
(resid 29 name HN)	(resid 31 name HN)	3.50	(resid 35 name HD21)	(resid 36 name HD1)	5.00
(resid 29 name HN)	(resid 50 name HA)	5.00	(resid 35 name HD21)	(resid 36 name HD2)	5.00
(resid 29 name HN)	(resid 50 name HG2*)	2.70	(resid 35 name HD21)	(resid 37 name HN)	5.00
(resid 29 name HN)	(resid 51 name HN)	5.00	(resid 35 name HD21)	(resid 38 name HG1)	5.00
(resid 29 name HN)	(resid 53 name HB*)	5.00	(resid 35 name HD22)	(resid 18 name HB1)	5.00
(resid 30 name HA1)	(resid 31 name HA)	5.00	(resid 35 name HD22)	(resid 18 name HB2)	5.00
(resid 30 name HA2)	(resid 31 name HA)	5.00	(resid 35 name HD22)	(resid 19 name HA)	5.00
(resid 30 name HN)	(resid 27 name HA2)	5.00	(resid 35 name HD22)	(resid 19 name HB2)	5.00
(resid 30 name HN)	(resid 28 name HA)	3.50	(resid 35 name HD22)	(resid 19 name HD1)	5.00
(resid 30 name HN)	(resid 29 name HA)	3.50	(resid 35 name HD22)	(resid 19 name HG*)	5.00
(resid 30 name HN)	(resid 29 name HB1)	5.00	(resid 35 name HD22)	(resid 22 name HA)	5.00
(resid 30 name HN)	(resid 29 name HB2)	5.00	(resid 35 name HD22)	(resid 36 name HD1)	5.00
(resid 30 name HN)	(resid 31 name HB*)	5.00	(resid 35 name HD22)	(resid 37 name HN)	5.00
(resid 30 name HN)	(resid 31 name HN)	2.70	(resid 35 name HD22)	(resid 38 name HG1)	5.00
(resid 30 name HN)	(resid 50 name HG2*)	5.00	(resid 35 name HD22)	(resid 38 name HN)	5.00
(resid 31 name HE22)	(resid 46 name HD*)	5.00	(resid 35 name HN)	(resid 22 name HD1*)	5.00
(resid 31 name HN)	(resid 27 name HA1)	5.00	(resid 35 name HN)	(resid 22 name HD2*)	5.00
(resid 31 name HN)	(resid 27 name HA2)	5.00	(resid 35 name HN)	(resid 24 name HA)	5.00
(resid 31 name HN)	(resid 28 name HN)	5.00	(resid 35 name HN)	(resid 33 name HA)	5.00
(resid 31 name HN)	(resid 29 name HA)	5.00	(resid 35 name HN)	(resid 33 name HB2)	5.00
(resid 31 name HN)	(resid 29 name HB1)	5.00	(resid 35 name HN)	(resid 34 name HA)	3.50
(resid 31 name HN)	(resid 29 name HB2)	5.00	(resid 35 name HN)	(resid 34 name HB1)	3.50
(resid 31 name HN)	(resid 30 name HA1)	3.50	(resid 35 name HN)	(resid 34 name HB2)	3.50
(resid 31 name HN)	(resid 30 name HA2)	3.50	(resid 35 name HN)	(resid 34 name HD22)	5.00
(resid 31 name HN)	(resid 32 name HA)	5.00	(resid 35 name HN)	(resid 34 name HN)	3.50
(resid 31 name HN)	(resid 32 name HN)	5.00	(resid 35 name HN)	(resid 36 name HD2)	5.00
(resid 31 name HN)	(resid 50 name HG2*)	5.00	(resid 35 name HN)	(resid 38 name HB1)	3.50
(resid 32 name HA)	(resid 25 name HG2*)	5.00	(resid 35 name HN)	(resid 38 name HB2)	2.70
(resid 32 name HB)	(resid 31 name HA)	5.00	(resid 35 name HN)	(resid 38 name HG1)	5.00
(resid 32 name HB)	(resid 57 name HG*)	5.00	(resid 35 name HN)	(resid 38 name HG2)	5.00
(resid 32 name HG2*)	(resid 24 name HA)	5.00	(resid 35 name HN)	(resid 38 name HN)	5.00
(resid 32 name HG2*)	(resid 24 name HB1)	5.00	(resid 37 name HN)	(resid 18 name HA)	5.00
(resid 32 name HG2*)	(resid 24 name HB2)	5.00	(resid 37 name HN)	(resid 19 name HG*)	5.00
(resid 32 name HG2*)	(resid 25 name HG2*)	3.50	(resid 37 name HN)	(resid 35 name HA)	5.00
(resid 32 name HG2*)	(resid 57 name HA)	2.70	(resid 37 name HN)	(resid 35 name HB1)	5.00
(resid 32 name HG2*)	(resid 57 name HB*)	5.00	(resid 37 name HN)	(resid 35 name HB2)	5.00
(resid 32 name HG2*)	(resid 57 name HE*)	5.00	(resid 37 name HN)	(resid 36 name HA)	5.00
(resid 32 name HG2*)	(resid 57 name HG*)	3.50	(resid 37 name HN)	(resid 36 name HB1)	5.00
(resid 32 name HN)	(resid 31 name HA)	2.70	(resid 37 name HN)	(resid 36 name HB2)	3.50
(resid 32 name HN)	(resid 31 name HB1)	5.00	(resid 37 name HN)	(resid 36 name HD1)	5.00
(resid 32 name HN)	(resid 31 name HB2)	3.50	(resid 37 name HN)	(resid 36 name HD2)	3.50
(resid 32 name HN)	(resid 31 name HG*)	5.00	(resid 37 name HN)	(resid 38 name HN)	2.70
(resid 32 name HN)	(resid 33 name HN)	5.00	(resid 38 name HN)	(resid 18 name HB2)	5.00
(resid 33 name HA)	(resid 25 name HG2*)	5.00	(resid 38 name HN)	(resid 35 name HA)	5.00
(resid 33 name HD*)	(resid 25 name HG2*)	5.00	(resid 38 name HN)	(resid 35 name HB1)	5.00
(resid 33 name HD*)	(resid 27 name HA2)	5.00	(resid 38 name HN)	(resid 36 name HA)	5.00
(resid 33 name HD*)	(resid 32 name HA)	5.00	(resid 38 name HN)	(resid 37 name HA)	5.00
(resid 33 name HD*)	(resid 34 name HN)	5.00	(resid 38 name HN)	(resid 37 name HB2)	5.00
(resid 33 name HD*)	(resid 39 name HA)	5.00	(resid 38 name HN)	(resid 39 name HB*)	5.00

(resid 39 name HN)	(resid 41 name HN)	5.00	(resid 46 name HN)	(resid 48 name HN)	5.00
(resid 40 name HN)	(resid 38 name HA)	5.00	(resid 47 name HN)	(resid 43 name HA)	5.00
(resid 40 name HN)	(resid 39 name HA)	5.00	(resid 47 name HN)	(resid 43 name HB*)	5.00
(resid 40 name HN)	(resid 39 name HB1)	3.50	(resid 47 name HN)	(resid 44 name HA)	5.00
(resid 40 name HN)	(resid 39 name HB2)	5.00	(resid 47 name HN)	(resid 45 name HA)	5.00
(resid 40 name HN)	(resid 39 name HD1*)	5.00	(resid 47 name HN)	(resid 46 name HA)	3.50
(resid 40 name HN)	(resid 39 name HD2*)	5.00	(resid 47 name HN)	(resid 46 name HB*)	5.00
(resid 40 name HN)	(resid 39 name HG)	5.00	(resid 47 name HN)	(resid 46 name HG*)	5.00
(resid 40 name HN)	(resid 41 name HN)	3.50	(resid 47 name HN)	(resid 48 name HG2*)	5.00
(resid 40 name HN)	(resid 42 name HN)	5.00	(resid 47 name HN)	(resid 48 name HN)	2.70
(resid 41 name HB1)	(resid 38 name HA)	3.50	(resid 48 name HA)	(resid 47 name HA)	5.00
(resid 41 name HB2)	(resid 38 name HA)	3.50	(resid 48 name HN)	(resid 43 name HB*)	5.00
(resid 41 name HN)	(resid 16 name HD*)	5.00	(resid 48 name HN)	(resid 46 name HB*)	5.00
(resid 41 name HN)	(resid 38 name HA)	3.50	(resid 48 name HN)	(resid 47 name HA)	3.50
(resid 41 name HN)	(resid 39 name HA)	5.00	(resid 48 name HN)	(resid 47 name HG*)	5.00
(resid 41 name HN)	(resid 40 name HA)	5.00	(resid 48 name HN)	(resid 49 name HN)	5.00
(resid 41 name HN)	(resid 40 name HB1)	3.50	(resid 48 name HN)	(resid 50 name HN)	5.00
(resid 41 name HN)	(resid 40 name HB2)	5.00	(resid 49 name HD21)	(resid 51 name HE*)	5.00
(resid 41 name HN)	(resid 42 name HN)	3.50	(resid 49 name HN)	(resid 48 name HA)	3.50
(resid 41 name HN)	(resid 43 name HN)	5.00	(resid 49 name HN)	(resid 48 name HB)	5.00
(resid 42 name HB1)	(resid 39 name HA)	5.00	(resid 49 name HN)	(resid 48 name HG2*)	5.00
(resid 42 name HB2)	(resid 39 name HA)	5.00	(resid 49 name HN)	(resid 50 name HN)	3.50
(resid 42 name HN)	(resid 33 name HD*)	5.00	(resid 50 name HB)	(resid 39 name HD2*)	5.00
(resid 42 name HN)	(resid 38 name HA)	5.00	(resid 50 name HG2*)	(resid 27 name HA1)	5.00
(resid 42 name HN)	(resid 39 name HA)	3.50	(resid 50 name HN)	(resid 39 name HD2*)	5.00
(resid 42 name HN)	(resid 39 name HD2*)	5.00	(resid 50 name HN)	(resid 43 name HA)	5.00
(resid 42 name HN)	(resid 41 name HA)	5.00	(resid 50 name HN)	(resid 48 name HB)	5.00
(resid 42 name HN)	(resid 41 name HB1)	2.70	(resid 50 name HN)	(resid 49 name HA)	2.70
(resid 42 name HN)	(resid 41 name HB2)	3.50	(resid 50 name HN)	(resid 49 name HB1)	5.00
(resid 42 name HN)	(resid 41 name HD*)	5.00	(resid 50 name HN)	(resid 49 name HB2)	5.00
(resid 42 name HN)	(resid 43 name HN)	3.50	(resid 50 name HN)	(resid 51 name HN)	5.00
(resid 42 name HN)	(resid 44 name HN)	5.00	(resid 51 name HB1)	(resid 39 name HD1*)	5.00
(resid 43 name HB1)	(resid 40 name HA)	5.00	(resid 51 name HB1)	(resid 52 name HA)	5.00
(resid 43 name HB2)	(resid 40 name HA)	3.50	(resid 51 name HB2)	(resid 39 name HD1*)	5.00
(resid 43 name HD21)	(resid 39 name HA)	5.00	(resid 51 name HN)	(resid 28 name HB2)	5.00
(resid 43 name HD21)	(resid 39 name HD1*)	5.00	(resid 51 name HN)	(resid 50 name HA)	2.70
(resid 43 name HD21)	(resid 39 name HD2*)	5.00	(resid 51 name HN)	(resid 50 name HG2*)	3.50
(resid 43 name HD21)	(resid 39 name HG)	5.00	(resid 52 name HA)	(resid 25 name HB)	5.00
(resid 43 name HD21)	(resid 40 name HA)	5.00	(resid 52 name HA)	(resid 25 name HG1*)	5.00
(resid 43 name HD21)	(resid 40 name HB2)	5.00	(resid 52 name HA)	(resid 50 name HG2*)	5.00
(resid 43 name HD21)	(resid 50 name HB)	3.50	(resid 52 name HA)	(resid 51 name HB2)	5.00
(resid 43 name HD21)	(resid 50 name HG2*)	5.00	(resid 52 name HA)	(resid 53 name HA)	5.00
(resid 43 name HD21)	(resid 50 name HN)	5.00	(resid 52 name HD*)	(resid 25 name HB)	5.00
(resid 43 name HD22)	(resid 39 name HD1*)	5.00	(resid 52 name HD*)	(resid 25 name HG1*)	5.00
(resid 43 name HD22)	(resid 39 name HD2*)	5.00	(resid 52 name HG2*)	(resid 25 name HG1*)	5.00
(resid 43 name HD22)	(resid 39 name HG)	5.00	(resid 52 name HG2*)	(resid 26 name HA)	5.00
(resid 43 name HD22)	(resid 40 name HA)	5.00	(resid 52 name HG2*)	(resid 53 name HA)	5.00
(resid 43 name HD22)	(resid 40 name HB2)	5.00	(resid 52 name HG2*)	(resid 53 name HG*)	5.00
(resid 43 name HD22)	(resid 50 name HB)	5.00	(resid 52 name HG2*)	(resid 54 name HA)	5.00
(resid 43 name HD22)	(resid 50 name HN)	5.00	(resid 52 name HG2*)	(resid 55 name HA)	5.00
(resid 43 name HN)	(resid 39 name HA)	5.00	(resid 52 name HN)	(resid 39 name HD1*)	5.00
(resid 43 name HN)	(resid 39 name HD2*)	5.00	(resid 52 name HN)	(resid 51 name HA)	2.70
(resid 43 name HN)	(resid 39 name HG)	5.00	(resid 52 name HN)	(resid 51 name HB1)	2.70
(resid 43 name HN)	(resid 40 name HA)	5.00	(resid 52 name HN)	(resid 51 name HB2)	3.50
(resid 43 name HN)	(resid 41 name HB1)	5.00	(resid 52 name HN)	(resid 53 name HN)	5.00
(resid 43 name HN)	(resid 41 name HB2)	5.00	(resid 53 name HB*)	(resid 28 name HA)	3.50
(resid 43 name HN)	(resid 42 name HA)	5.00	(resid 53 name HB*)	(resid 28 name HB1)	5.00
(resid 43 name HN)	(resid 42 name HB*)	3.50	(resid 53 name HB*)	(resid 28 name HB2)	3.50
(resid 43 name HN)	(resid 42 name HG2)	5.00	(resid 53 name HB*)	(resid 52 name HA)	5.00
(resid 43 name HN)	(resid 44 name HN)	2.70	(resid 53 name HB*)	(resid 52 name HG2*)	5.00
(resid 43 name HN)	(resid 45 name HN)	5.00	(resid 53 name HB*)	(resid 54 name HA)	5.00
(resid 44 name HN)	(resid 16 name HE*)	5.00	(resid 53 name HB*)	(resid 54 name HB1)	5.00
(resid 44 name HN)	(resid 40 name HA)	5.00	(resid 53 name HB*)	(resid 54 name HB2)	5.00
(resid 44 name HN)	(resid 41 name HA)	5.00	(resid 53 name HD*)	(resid 28 name HA)	3.50
(resid 44 name HN)	(resid 43 name HA)	5.00	(resid 53 name HD*)	(resid 54 name HN)	5.00
(resid 44 name HN)	(resid 43 name HB*)	3.50	(resid 53 name HG*)	(resid 26 name HB2)	5.00
(resid 44 name HN)	(resid 45 name HG1*)	5.00	(resid 53 name HG*)	(resid 28 name HA)	5.00
(resid 44 name HN)	(resid 45 name HN)	2.70	(resid 53 name HG*)	(resid 54 name HA)	5.00
(resid 44 name HN)	(resid 46 name HN)	5.00	(resid 53 name HG*)	(resid 54 name HB1)	5.00
(resid 45 name HD*)	(resid 42 name HA)	5.00	(resid 53 name HG*)	(resid 54 name HB2)	5.00
(resid 45 name HG1*)	(resid 42 name HA)	5.00	(resid 53 name HN)	(resid 25 name HB)	5.00
(resid 45 name HN)	(resid 42 name HA)	5.00	(resid 53 name HN)	(resid 26 name HB1)	5.00
(resid 45 name HN)	(resid 43 name HA)	5.00	(resid 53 name HN)	(resid 27 name HA1)	5.00
(resid 45 name HN)	(resid 44 name HA)	5.00	(resid 53 name HN)	(resid 27 name HA2)	5.00
(resid 45 name HN)	(resid 44 name HB1)	3.50	(resid 53 name HN)	(resid 28 name HA)	5.00
(resid 45 name HN)	(resid 44 name HB2)	5.00	(resid 53 name HN)	(resid 28 name HB2)	5.00
(resid 45 name HN)	(resid 44 name HD*)	5.00	(resid 53 name HN)	(resid 52 name HA)	2.70
(resid 45 name HN)	(resid 44 name HG)	5.00	(resid 53 name HN)	(resid 52 name HD*)	5.00
(resid 45 name HN)	(resid 46 name HN)	3.50	(resid 53 name HN)	(resid 52 name HG1*)	5.00
(resid 45 name HN)	(resid 47 name HN)	5.00	(resid 53 name HN)	(resid 52 name HG2*)	3.50
(resid 46 name HN)	(resid 43 name HA)	5.00	(resid 53 name HN)	(resid 54 name HA)	5.00
(resid 46 name HN)	(resid 44 name HA)	5.00	(resid 53 name HN)	(resid 54 name HN)	2.70
(resid 46 name HN)	(resid 45 name HA)	5.00	(resid 54 name HA)	(resid 55 name HG2*)	5.00
(resid 46 name HN)	(resid 45 name HB)	3.50	(resid 54 name HB1)	(resid 26 name HB1)	5.00
(resid 46 name HN)	(resid 45 name HD*)	5.00	(resid 54 name HB1)	(resid 26 name HB2)	5.00
(resid 46 name HN)	(resid 45 name HG1*)	3.50	(resid 54 name HB2)	(resid 26 name HB1)	5.00
(resid 46 name HN)	(resid 45 name HG2*)	5.00	(resid 54 name HB2)	(resid 26 name HB2)	5.00
(resid 46 name HN)	(resid 47 name HA)	5.00	(resid 54 name HN)	(resid 25 name HA)	5.00
(resid 46 name HN)	(resid 47 name HN)	2.70	(resid 54 name HN)	(resid 25 name HB)	5.00

```

(resid 54 name HN ) (resid 26 name HA ) 5.00 | (resid 57 name HA ) (resid 24 name HA ) 5.00
(resid 54 name HN ) (resid 26 name HB1 ) 3.50 | (resid 57 name HA ) (resid 32 name HA ) 5.00
(resid 54 name HN ) (resid 26 name HB2 ) 5.00 | (resid 57 name HA ) (resid 56 name HA2 ) 5.00
(resid 54 name HN ) (resid 52 name HA ) 5.00 | (resid 57 name HB* ) (resid 32 name HB ) 5.00
(resid 54 name HN ) (resid 52 name HG2*) 2.70 | (resid 57 name HD*) (resid 32 name HG2*) 5.00
(resid 54 name HN ) (resid 53 name HA ) 3.50 | (resid 57 name HG2 ) (resid 32 name HB ) 5.00
(resid 54 name HN ) (resid 53 name HB*) 2.70 | (resid 57 name HN ) (resid 24 name HA ) 5.00
(resid 54 name HN ) (resid 53 name HG*) 3.50 | (resid 57 name HN ) (resid 24 name HB1 ) 5.00
(resid 54 name HN ) (resid 55 name HA ) 5.00 | (resid 57 name HN ) (resid 24 name HB2 ) 5.00
(resid 54 name HN ) (resid 55 name HN ) 5.00 | (resid 57 name HN ) (resid 24 name HG*) 5.00
(resid 55 name HA ) (resid 25 name HB ) 5.00 | (resid 57 name HN ) (resid 25 name HA ) 5.00
(resid 55 name HA ) (resid 54 name HA ) 5.00 | (resid 57 name HN ) (resid 32 name HG2*) 5.00
(resid 55 name HB ) (resid 25 name HA ) 5.00 | (resid 57 name HN ) (resid 56 name HA1 ) 2.70
(resid 55 name HB ) (resid 25 name HG1*) 5.00 | (resid 57 name HN ) (resid 56 name HA2 ) 2.70
(resid 55 name HG2*) (resid 25 name HA ) 5.00 | (resid 57 name HN ) (resid 58 name HN ) 5.00
(resid 55 name HN ) (resid 26 name HN ) 5.00 | (resid 58 name HA ) (resid 32 name HG2*) 5.00
(resid 55 name HN ) (resid 52 name HG2*) 5.00 | (resid 58 name HA ) (resid 57 name HA ) 5.00
(resid 55 name HN ) (resid 54 name HA ) 2.70 | (resid 58 name HB2 ) (resid 32 name HG2*) 5.00
(resid 55 name HN ) (resid 54 name HB1 ) 3.50 | (resid 58 name HN ) (resid 26 name HA ) 5.00
(resid 55 name HN ) (resid 54 name HB2 ) 5.00 | (resid 58 name HN ) (resid 26 name HB2 ) 5.00
(resid 55 name HN ) (resid 56 name HN ) 5.00 | (resid 58 name HN ) (resid 32 name HA ) 5.00
(resid 56 name HA2 ) (resid 24 name HB2 ) 5.00 | (resid 58 name HN ) (resid 32 name HB ) 5.00
(resid 56 name HA2 ) (resid 24 name HD1 ) 5.00 | (resid 58 name HN ) (resid 32 name HG2*) 3.50
(resid 56 name HA2 ) (resid 24 name HG*) 5.00 | (resid 58 name HN ) (resid 57 name HA ) 2.70
(resid 56 name HN ) (resid 24 name HB2 ) 5.00 | (resid 58 name HN ) (resid 57 name HB*) 3.50
(resid 56 name HN ) (resid 24 name HG*) 5.00 | (resid 58 name HN ) (resid 57 name HD*) 5.00
(resid 56 name HN ) (resid 25 name HA ) 2.70 | (resid 58 name HN ) (resid 57 name HG*) 5.00
(resid 56 name HN ) (resid 25 name HB ) 5.00 | (resid 58 name HN ) (resid 59 name HN ) 5.00
(resid 56 name HN ) (resid 25 name HG1*) 3.50 | (resid 59 name HA ) (resid 58 name HA ) 5.00
(resid 56 name HN ) (resid 25 name HG2*) 5.00 | (resid 59 name HA ) (resid 58 name HB1 ) 5.00
(resid 56 name HN ) (resid 25 name HN ) 5.00 | (resid 59 name HN ) (resid 26 name HB2 ) 5.00
(resid 56 name HN ) (resid 55 name HA ) 2.70 | (resid 59 name HN ) (resid 58 name HA ) 2.70
(resid 56 name HN ) (resid 55 name HG2*) 5.00 | (resid 59 name HN ) (resid 58 name HB1 ) 3.50
(resid 56 name HN ) (resid 57 name HN ) 5.00 | (resid 59 name HN ) (resid 58 name HB2 ) 5.00

```

10.3.2 Distanzbeschränkungen für GPdom15

Wie für GPdom15kurz (Kapitel 10.3.1.) angegeben, jedoch abweichend:

```

(resid 59 name HN ) (resid 58 name HA ) 3.50 | (resid 59 name HN ) (resid 58 name HB1 ) 5.00

```

Und zusätzlich folgende Abstandsbeschränkungen:

```

(resid 59 name HN ) (resid 60 name HN ) 2.70 | (resid 65 name HN ) (resid 64 name HB*) 3.50
(resid 60 name HN ) (resid 57 name HD*) 5.00 | (resid 66 name HN ) (resid 65 name HA*) 3.50
(resid 60 name HN ) (resid 58 name HB2 ) 5.00 | (resid 67 name HN ) (resid 66 name HA ) 3.50
(resid 60 name HN ) (resid 59 name HA ) 3.50 | (resid 68 name HN ) (resid 67 name HA ) 3.50
(resid 60 name HN ) (resid 61 name HB*) 5.00 | (resid 68 name HN ) (resid 69 name HN ) 2.70
(resid 61 name HN ) (resid 59 name HG*) 5.00 | (resid 70 name HN ) (resid 69 name HA ) 5.00
(resid 61 name HN ) (resid 60 name HG*) 3.50 | (resid 71 name HN ) (resid 69 name HA ) 5.00
(resid 62 name HN ) (resid 60 name HG*) 5.00 | (resid 71 name HN ) (resid 69 name HB*) 5.00
(resid 63 name HN ) (resid 62 name HA ) 2.70 | (resid 71 name HN ) (resid 70 name HA ) 3.50
(resid 63 name HN ) (resid 62 name HB*) 3.50 | (resid 74 name HN ) (resid 75 name HA ) 5.00
(resid 65 name HN ) (resid 64 name HA ) 3.50

```

10.3.3 Beschränkungen der Diederwinkel aus ³J(HN, H_α)-Kopplungskonstanten

```

(resid 3 name C) (resid 4 name N) (resid 4 name CA) (resid 4 name C) 1 -60 20 2
(resid 5 name C) (resid 6 name N) (resid 6 name CA) (resid 6 name C) 1 -60 20 2
(resid 9 name C) (resid 10 name N) (resid 10 name CA) (resid 10 name C) 1 -120 40 2
(resid 10 name C) (resid 11 name N) (resid 11 name CA) (resid 11 name C) 1 -120 40 2
(resid 13 name C) (resid 14 name N) (resid 14 name CA) (resid 14 name C) 1 -120 20 2
(resid 16 name C) (resid 17 name N) (resid 17 name CA) (resid 17 name C) 1 -120 40 2
(resid 19 name C) (resid 20 name N) (resid 20 name CA) (resid 20 name C) 1 -120 40 2
(resid 20 name C) (resid 21 name N) (resid 21 name CA) (resid 21 name C) 1 -60 20 2
(resid 22 name C) (resid 23 name N) (resid 23 name CA) (resid 23 name C) 1 -120 40 2
(resid 24 name C) (resid 25 name N) (resid 25 name CA) (resid 25 name C) 1 -120 40 2
(resid 25 name C) (resid 26 name N) (resid 26 name CA) (resid 26 name C) 1 -120 40 2
(resid 27 name C) (resid 28 name N) (resid 28 name CA) (resid 28 name C) 1 -60 20 2
(resid 28 name C) (resid 29 name N) (resid 29 name CA) (resid 29 name C) 1 -120 40 2
(resid 30 name C) (resid 31 name N) (resid 31 name CA) (resid 31 name C) 1 -120 40 2
(resid 32 name C) (resid 33 name N) (resid 33 name CA) (resid 33 name C) 1 -120 40 2
(resid 33 name C) (resid 34 name N) (resid 34 name CA) (resid 34 name C) 1 -60 20 2
(resid 36 name C) (resid 37 name N) (resid 37 name CA) (resid 37 name C) 1 -60 20 2
(resid 37 name C) (resid 38 name N) (resid 38 name CA) (resid 38 name C) 1 -60 20 2
(resid 39 name C) (resid 40 name N) (resid 40 name CA) (resid 40 name C) 1 -60 20 2
(resid 40 name C) (resid 41 name N) (resid 41 name CA) (resid 41 name C) 1 -60 20 2

```

```
(resid 41 name C) (resid 42 name N) (resid 42 name CA) (resid 42 name C) 1 -60 20 2
(resid 42 name C) (resid 43 name N) (resid 43 name CA) (resid 43 name C) 1 -60 20 2
(resid 43 name C) (resid 44 name N) (resid 44 name CA) (resid 44 name C) 1 -60 20 2
(resid 44 name C) (resid 45 name N) (resid 45 name CA) (resid 45 name C) 1 -60 20 2
(resid 49 name C) (resid 50 name N) (resid 50 name CA) (resid 50 name C) 1 -60 20 2
(resid 50 name C) (resid 51 name N) (resid 51 name CA) (resid 51 name C) 1 -120 40 2
(resid 52 name C) (resid 53 name N) (resid 53 name CA) (resid 53 name C) 1 -120 40 2
(resid 56 name C) (resid 57 name N) (resid 57 name CA) (resid 57 name C) 1 -60 20 2
(resid 57 name C) (resid 58 name N) (resid 58 name CA) (resid 58 name C) 1 -60 20 2
```

10.3.4 Beschränkungen durch Wasserstoffbrücken

```
(resid 4 name HN) (resid 1 name O ) 2.3      (resid 38 name HN) (resid 35 name OD1) 2.3
(resid 4 name N ) (resid 1 name O ) 3.1      (resid 38 name N ) (resid 35 name OD1) 3.1
(resid 25 name HN) (resid 33 name O ) 2.3     (resid 39 name HN) (resid 36 name O ) 2.3
(resid 25 name N ) (resid 33 name O ) 3.1     (resid 39 name N ) (resid 36 name O ) 3.1
(resid 26 name HN) (resid 54 name O ) 2.3     (resid 43 name HN) (resid 39 name O ) 2.3
(resid 26 name N ) (resid 54 name O ) 3.1     (resid 43 name N ) (resid 39 name O ) 3.1
(resid 27 name HN) (resid 31 name O ) 2.3     (resid 44 name HN) (resid 40 name O ) 2.3
(resid 27 name N ) (resid 31 name O ) 3.1     (resid 44 name N ) (resid 40 name O ) 3.1
(resid 28 name HN) (resid 51 name O ) 2.3     (resid 44 name HN) (resid 41 name O ) 2.3
(resid 28 name N ) (resid 51 name O ) 3.1     (resid 44 name N ) (resid 41 name O ) 3.1
(resid 30 name HN) (resid 27 name O ) 2.3     (resid 46 name HN) (resid 42 name O ) 2.3
(resid 30 name N ) (resid 27 name O ) 3.1     (resid 46 name N ) (resid 42 name O ) 3.1
(resid 33 name HN) (resid 25 name O ) 2.3     (resid 53 name HN) (resid 26 name O ) 2.3
(resid 33 name N ) (resid 25 name O ) 3.1     (resid 53 name N ) (resid 26 name O ) 3.1
```

10.4 XPLOR-Protokolle

10.4.1 generate_structure.inp: Protokoll zum Erstellen der Strukturdateien dom15_kurz.psf bzw. dom15.psf

```
! generiert structure-output fuer koordinaten-generation

topology
    @topallhdg.pn
end

parameter
    @parallhdg_min2.pn
end

segment
    name=" "
    chain
    @./toph19.pep
        link pept head - * tail + * end
        first prop tail + pro end          ! special n-ter for PRO
        first nter      tail + * end
        last cter head - *      end
        sequence @../INPUT/dom15_sequ_3bst end
    end
end

patch DISU                                     {*cluster and the protein. *}
    reference=1=( resid 5 )
    reference=2=( resid 40 )
end

patch DISU                                     {*cluster and the protein. *}
    reference=1=( resid 18 )
    reference=2=( resid 37 )
end

patch DISU                                     {*cluster and the protein. *}
    reference=1=( resid 26 )
    reference=2=( resid 58 )
end

write structure output=dom15.psf end

stop
```

10.4.2 generate_template.inp: Protokoll zum Erstellen der Strukturdateien dom15_kurz_template.pdb bzw. dom15_template.pdb

```

remarks  file  nmr/generate_template.inp
remarks  generates a "template" coordinate set.  This produces
remarks  an arbitrary extended conformation with ideal geometry.
remarks  author: Axel T. Brunger

{====>}
structure @../INPUT/dom15.psf end                { * read structure file * }

parameter
{====>}
  @parallhdg_min2.pn                            { * read parameters * }
end

topology
  presidue NDIS
    delete bond 1SG 2SG
    delete angle 1CB 1SG 2SG
    delete angle 1SG 2SG 2CB
  end
end

{====>}
{ * if your protein contains S-S bridges appropriately modify and  * }
{ * then uncomment the following lines.                            * }

patch ndis reference=1=( residue 5 ) reference=2=( residue 40 ) end
patch ndis reference=1=( residue 18 ) reference=2=( residue 37 ) end
patch ndis reference=1=( residue 26 ) reference=2=( residue 58 ) end

vector ident (x) ( all )
vector do (x=x/10.) ( all )
vector do (y=random(0.5) ) ( all )
vector do (z=random(0.5) ) ( all )

vector do (fbeta=50) (all)                { * friction coefficient, in 1/ps * }
vector do (mass=100) (all)                { * heavy masses, in amu      * }

parameter
  nbonds
    cutnb=5.5 rcon=20. nbxmod=-2 repel=0.9  wmin=0.1 tolerance=1.
    rexp=2 irexp=2 inhibit=0.25
  end
end

flags exclude * include bond angle vdw end

minimize powell nstep=50 nprint=10 end

flags include impr end

minimize powell nstep=50 nprint=10 end

dynamics verlet
  nstep=50 timestep=0.001 iasvel=maxwell firsttemp= 300.
  tcoupling = true tbath = 300. nprint=50 iprfrq=0
end

parameter
  nbonds
    rcon=2. nbxmod=-3 repel=0.75
  end
end

minimize powell nstep=100 nprint=25 end

dynamics verlet
  nstep=500 timestep=0.005 iasvel=maxwell firsttemp= 300.
  tcoupling = true tbath = 300. nprint=100 iprfrq=0
end

flags exclude vdw elec end
vector do (mass=1.) ( name h* )
hbuild selection=( name h* ) phistep=360 end
flags include vdw elec end

```



```

minimize powell nstep=2000 nprint=50 end
                                { * write coordinates * }
remarks produced by nmr/generate_template.inp
write coordinates output=dom15_template.pdb end

stop

```

10.4.3 sa_dom15.inp: *simulated annealing* Protokoll

```

remarks sa_1.inp
remarks Author: Michael Nilges

evaluate ($ini_count = 90)
evaluate ($end_count = 95)

evaluate ($iniseed = 100046)
evaluate ($iniseed2 = 554321) !changed HS
evaluate ($iniseed3 = 204875) !changed HS
evaluate ($iniseed4 = 395164) !changed HS

evaluate ($init_t = 2000 ) { * initial simulated annealing temperature * }
evaluate ($high_steps = 120000) !3x20000 bei 3fs
evaluate ($cool1_steps = 240000) !3x30000 bei 2fs
evaluate ($cool2_steps = 120000) !3x15000 bei 2fs

evaluate ($fileroot = "../Runs/RUN_dom15/dom15_200304_")
evaluate ($template = "../INPUT/dom15_template.pdb")

structure @@../INPUT/dom15.psf end

parameter @@../INPUT/parallhdg_min.pn end

parameter nbfix S S 462 13.6 462 13.6 end
parameter
    bond (name sg) (name sg) 0.0 TOKEN
    angle (all) (name sg) (name sg) 0.0 TOKEN
end

noe
    reset
    nrestraints = 5000 ! allocate space for NOEs
    ceiling 100

    class dist
        @../INPUT/NOE_dom15_030304.longnoes
        @../INPUT/NOE_dom15_030304.mediumnoes
        @../INPUT/NOE_dom15_030304.sequentialnoes
        @../INPUT/H_BONDS_dom15_final.list

    set echo on message on end

    averaging * sum
    potential * soft
    scale * 1.0
    sqconstant * 1.0
    sqexponent * 2
    soexponent * 1
    rswitch * 1.0
    sqoffset * 0.0
    asymptote * 2.0
end

noe
    assign (resid 5 and name SG)(resid 40 and name SG) 2.02 2.02 0.1
    assign (resid 18 and name SG)(resid 37 and name SG) 2.02 2.02 0.1
    assign (resid 26 and name SG)(resid 58 and name SG) 2.02 2.02 0.1
end

restraints dihedral
    nassign=1000
                                @@../INPUT/WINKEL_dom15_final.list

end

```

```

couplings
  potential harmonic
  class phi
  force 1.0
  nres 300
  set echo on message on end
! @../input/coupl.list
!set echo off message off end
end

!inserted HS

evaluate ($krama = 2.0)
evaluate ($ramacoff = -0.5*10.0**2)

rama
nres=10000
!set message off echo off end

  cutoff=$ramacoff

      @./torsions_gaussians/shortrange_gaussians.tbl      !*for norama_check
      @./torsions_gaussians/new_shortrange_force.tbl      !*for norama_check

! @./torsions_gaussians/all_na_gaussians.tbl
! @./torsions_gaussians/force_nucleic.tbl

end

set message on echo on end

  @./torsions_gaussians/newshortrange_setup.tbl      !*for norama_check
!@./torsions_gaussians/setup_nucleic_new.tbl

flags exclude * include bonds angle impr vdw noe cdih end

set echo on message on end

@setup_swap_orig.hs

vector ident (store2) (store1)
parameter
  improper (store2) (store2) (all) (all) 0.0 TOKEN TOKEN
  improper (all) (all) (store2) (store2) 0.0 TOKEN TOKEN
end

set echo false message false end

vector do (fbeta=10) (all)      {* friction coefficient for MD heatbath, in 1/ps
*}
vector do (mass=100) (all)

evaluate ($kcdih = 5)
restraints dihedral
  scale=$kcdih
end

evaluate ($count = $ini_count)
while ($count < $end_count ) loop main

  evaluate ($count=$count+1)
  evaluate ($nreassign = 0)

  coor @$template

  evaluate ($seed =$count*$iniseed)

if ($count > 60) then
  evaluate ($seed =($count-60)*$iniseed2)
end if

if ($count > 120) then
  evaluate ($seed =($count-120)*$iniseed3)
end if

if ($count > 180) then

```

```

    evaluate ($seed = ($count-180)*$iniseed4)
end if

    set seed $seed end
    @sa_l_randomchain.xplor

    evaluate ($cpul = $cpu)

    evaluate ($final1_t = 1000)      { K }
    evaluate ($final2_t = 100)      { K }
    evaluate ($tempstep = 50)       { K }

    evaluate ($ncycle = ($init_t-$final1_t)/$tempstep)
    evaluate ($nstep = int($cooll_steps/$ncycle))

    @@sa_l_initial_values.xplor
    parameter
        angle (store2) (all) (store2) $ini_flt TOKEN
        angle (all)      (all) (store2) $ini_flt TOKEN
    end

    parameter nbonds
        atom cutnb 12 tolerance 3.5 repel=1.2 wmin 0.5
        rexp=2 irexp=2 rcon=1. nbxmod 4
    end end

    @@sa_l_reduced.xplor { defines store1 }

    constraints
        interaction (all) (not store1) weights * 1 angl 1.0 impr 1.0 vdw 0.0 elec
0 end
        interaction (store1) (store1) weights * 1 angl 1.0 impr 1.0 vdw 0.1 elec
0 end
    end

    { * 1 ===== initial minimization * }
    restraints dihedral scale=5. end
    noe potential * soft scale * 1.0 asymptote * 2.0 end
    minimize powell nstep=50 drop=10. nprint=25 end

    { * 2 ===== high temperature dynamics* }

flags include bond angl impr vdw noe cdih end

    @sa_cyto_hightemp_2fs.xplor

flags include bond angl impr vdw noe cdih rama end

    { * 3 ===== cooling 1 * }

    @sa_cyto_cool1_1fs.xplor

    { * 4 ===== cooling 2 * }

    @sa_cyto_cool2_1fs.xplor

    { * 5 ===== final minimization* }

    evaluate ($swap = 1.001)
    flags exclude * include noe end
    @swap15v.xplor
    flags include bond angl impr vdw noe cdih rama end
    minimize powell nstep=500 drop=10.0 nprint=25 end
    flags exclude * include bond angl impr vdw noe cdih end
    minimize powell nstep=500 drop=10.0 nprint=25 end
    flags include bond angl impr vdw noe cdih rama end
    { * 6 ===== write out the final structure(s)* }

    evaluate ($filename=$fileroot+ encode($count)+ ".pdb")
    evaluate ($fname=$fileroot+ encode($count)+ ".prt")
    evaluate ($dname=$fileroot+ encode($count)+ ".dih") { cdih }

    print threshold=0.3 noe
    evaluate ($rms_noe=$result)
    evaluate ($violations_noe=$violations)
    print threshold=5. cdih
    evaluate ($rms_cdih=$result)
    evaluate ($violations_cdih=$violations)
    print thres=0.05 bonds

```

```

evaluate ($rms_bonds=$result)
print thres=0.5 angles
evaluate ($rms_angles=$result)
print thres=5. impropers
evaluate ($rms_impropers=$result)
remarks initial random number seed: $seed
remarks =====
remarks          overall,bonds,angles,improper,vdw,noe,cdih
remarks energies: $ener, $bond, $angl, $impr, $vdw, $noe, $cdih
remarks =====
remarks          bonds,angles,impropers,noe,cdih
remarks rms-dev.: $rms_bonds,$rms_angles,$rms_impropers,$rms_noe,$rms_cdi
remarks =====
remarks          noe, cdih
remarks violations.: $violations_noe, $violations_cdi
remarks =====
write coordinates sele= (not (resid 500)) output =$filename end

set print = $fname end
noe print thresh = 0.1 end
close $fname end

{ cdih}

    set print = $dname end
    print thresh = 0.001 cdih
    close $dname end

{ cdih}

end loop main

stop

```

10.4.4 ave_dom15.inp Protokoll

```

remarks file nmr/average.inp
remarks Computes the average structure, atomic rms differences from the
remarks mean for a family of structures, and average overall rms
remarks difference between the family and the mean structure.

{====>}
structure @/raid1/klaus/XPLOR/DOM15_KURZ/input/dom15_kurz.psf end          {*Read
the structure file.*}

{====>}          {"Backbone" selection--this example is typical for proteins.*}
vector idend (store8) ((not hydrogen)
                      and (residue 2:58))

vector idend (store9) ((name ca or name n or name c)
                      and (residue 2:58))

{*===== The first stage consists of computing the mean structure.*}

{====>}          {*Loop through the family of 10 accepted structures.*}
evaluate ($end_count=31)

eval ($nfile=0)
vector do (store1=0) (all)
vector do (store2=0) (all)
vector do (store3=0) (all)
vector do (store4=0) (all)

evaluate ($count = 0)
while ($count < $end_count ) loop main
    evaluate ($count=$count+1)

{====>}          {*This is the name of the family of structures.*}
    evaluate
($filename="/raid1/klaus/XPLOR/DOM15_KURZ/FINAL_DATA_010304/flip_dom15_kurz_010304_
"+encode($count)+".pdb")

    coor @@$filename

    if ($count=1) then

```

```

        coor copy end                                { *Store first structure in comparison set.* }
    end if
    coor sele=( recall9 ) fit end
    vector do (store1=store1+x) (all)
    vector do (store2=store2+y) (all)
    vector do (store3=store3+z) (all)
    vector do (store4=store4+x*x+y*y+z*z) (all)
    eval ($nfile=$nfile+1)
end loop main

vector do (x = store1 / $nfile) (all)
vector do (y = store2 / $nfile) (all)
vector do (z = store3 / $nfile) (all)
vector do (bcomp=sqrt(max(0,store4/$nfile-(x**2+y**2+z**2)))) (all)

        { *The second stage consists of computing an overall rms difference.* }

evaluate ($save_rmsd_all=0.)
evaluate ($save_rmsd_back=0.)

coor copy end

evaluate ($count = 0)
while ($count < $end_count ) loop main
    evaluate ($count=$count+1)

{====>}                                { *This is the name of the family of structures.* }
    evaluate
($filename="/raid1/klaus/XPLOR/DOM15_KURZ/FINAL_DATA_010304/flip_dom15_kurz_010304_
"+encode($count)+".pdb")

    coor @@ $filename
    coor fit sele=( recall9 ) end
    coor rms selection=( recall9 ) end
    evaluate ($save_rmsd_back=$save_rmsd_back + $result)
    coor rms selection=(recall8) end
    evaluate ($save_rmsd_all = $save_rmsd_all + $result)
end loop main

evaluate ($save_rmsd_back=$save_rmsd_back / $nfile)
evaluate ($save_rmsd_all = $save_rmsd_all / $nfile)
display ave. rms diff. to the mean struct. for non-h atoms= $save_rmsd_all
display ave. rms diff. to the mean struct. for the backbone= $save_rmsd_back

        { *==== Finally, the average structure and RMSDs are written to a file.* }
coor swap end
vector do (b=bcomp) ( all )

remarks unminimized average over $nfile files
remarks ave. rms diff. to the mean struct. for non-h atoms= $save_rmsd_all
remarks ave. rms diff. to the mean struct. for the backbone= $save_rmsd_back
remarks b array (last column) is the rms difference from the mean

{====>}                                { *Write average coordinates and RMSDs to specified file.* }
write coordinates
output="/raid1/klaus/XPLOR/DOM15_KURZ/FINAL_DATA_010304/ave_2to58_swap_31.pdb" end

stop

```

10.4.5 ave_plot_dom15.inp Protokoll

```

remarks file nnr/average_plot.inp -- Rmsds per residue
remarks Specific for proteins: backbone and side-chain atoms.
remarks
remarks Author: Axel T. Brunger

{====>}                                { *Read structure file.* }
structure @../input/dom15kurz.psf end

{====>}
coordinates @/raid1/klaus/XPLOR/DOM15_KURZ/FINAL_DATA_010304/ave_2to58_swap_31.pdb
{ *Read coordinates.* }

```

```

{====>}
vector ident (store9) ( tag )
{
  *This selects all residues to be*
  *analyzed. Change it*
  *to analyze portions,*
  *e.g., ( tag and segid "A" );*
  *"tag" assigns one unique atom*
  *per residue (see <selection>).*
}

{====>}
set display=/raid1/klaus/XPLOR/DOM15_KURZ/FINAL_DATA_010304/ave_2to58_swap_31_plot-
ted.list end
{
  *Write the plot information to the*
  *specified file.*
}

set echo=off end
set message=off end
{
  *Turn off echo to reduce output.*
  *Turn off warning messages.*
}

evaluate ($number=0)
for $atom_id in id ( store9 ) loop out2
  vector show norm ( b ) ( byresidue ( id $atom_id )
    and ( name ca or name n or name c ) )
  evaluate ( $back=$result )
  vector show norm ( b ) ( byresidue ( id $atom_id )
    and not hydrogen )
  evaluate ( $side=$result )
  vector show elem ( resid ) ( id $atom_id )

  evaluate ($number=$number+1)
  display $number $back $side
end loop out2

set echo=on end
set message=on end

stop

```

11 Danksagung

Diese Arbeit wurde im Zeitraum von Februar 2001 bis Juni 2004 am Lehrstuhl für Struktur und Chemie der Biopolymere der Universität Bayreuth unter der Leitung von PD Dr. Ute C. Marx angefertigt. Ihr danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, für zahlreiche Diskussionen und Denkanstöße.

Prof. Dr. Paul Rösch danke ich für die hervorragenden Arbeitsbedingungen und für die Möglichkeit zur Nutzung der gesamten Infrastruktur des Lehrstuhls sowie die fürsorgliche Hilfsbereitschaft.

Bezüglich spezieller Analysemethoden, die an unserem Lehrstuhl nicht verfügbar waren, danke ich Dr. med. Karin Metzner (Institut für Klinische und Molekulare Virologie; Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg) für die Kooperation und Durchführung von HIV-Infektionstests, sowie Prof. Dr. Christian P. Sommerhoff (Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie; Ludwig-Maximilians-Universität München) für die Kooperation und Ermittlung exakter Inhibitionsdaten, und Dr. Peter Kreutzmann (IPF PharmaCeuticals, Hannover) für die aminoternale Sequenzierung von GPdom15, den Nachweis der P1-P1'-Position sowie für die Bereitstellung des Plasmides pET-21a-HisVak15.

Ferner danke ich Rainer Hofmann für die guten Tipps nicht nur bei Computerproblemen, Dr. Kristian Schweimer und Dr. Philipp Neudecker für die Hilfestellungen in Sachen NMR-Spektroskopie, Ulrich Scheckenhofer für die Aufnahme von ESI-Massenspektren, Prof. Dr. Heinrich Sticht (Universität Erlangen) für stetige Diskussionsbereitschaft sowie umsichtige Ratschläge auch über den fachlichen Bereich hinaus. Dr. Thomas Lauber danke ich für die einführnden Hilfestellungen und Diskussionen beim LEKTI-Projekt, Gudrun Wagner und Angela Rössler für Hilfestellungen in Verwaltungsangelegenheiten, sowie allen anderen ehemaligen und aktiven Mitarbeitern des Lehrstuhls, insbesondere Dr. Katrin Lehmann, Anke Eisenmann, Finn Bauer, Wolfgang Reindl, Henning Tidow, Nadine Herz und Ulrike Herzing, für die stetige Hilfsbereitschaft und eine angenehme Arbeitsatmosphäre, die zum Gelingen dieser Arbeit wesentlich beigetragen haben.

12 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ferner erkläre ich, dass ich nicht anderweitig mit oder ohne Erfolg versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich der Doktorprüfung zu unterziehen.

Bayreuth, den